

Molekularbiologische Analyse der
Diguanylatzyklase DgcE sowie weiterer
biofilmrelevanter Proteine und Signale in
Escherichia coli

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Vanessa Pfiffer

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Regine Hengge
2. Prof. Dr. Kürsad Turgay
3. Prof. Dr. Marc Erhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2019

Diese Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regine Hengge an der Humboldt-Universität zu Berlin zwischen März 2014 und Januar 2019 angefertigt.

Publikationen

Sarenko, O., Klauck, G., Wilke, F. M., **Pfiffer, V.**, Richter, A. M., Herbst, S., Kaever, V. & Hengge, R. (2017). More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*. MBio 8(5), e01639 17. doi: 10.1128/mBio.01639-17.
<https://mbio.asm.org/content/8/5/e01639-17>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Regine Hengge, die mir diese Promotionsarbeit innerhalb ihrer Arbeitsgruppe und die Teilnahme an diversen Fachkonferenzen ermöglicht hat. Zahlreiche anregende Diskussionen haben maßgeblich dazu beigetragen, der Komplexität von DgcE Herr zu werden.

Für die Begutachtung dieser Arbeit möchte ich mich neben Prof. Dr. Regine Hengge bei Prof. Dr. Kürşad Turgay und Prof. Dr. Marc Erhardt bedanken. Auch Prof. Dr. Thomas Eitinger und Dr. Natalia Tschowri gilt mein Dank für die Teilnahme als Kommissionsmitglieder.

Ich danke Dr. Gisela Klauck und Dr. Diego Serra, von deren fachlicher Kompetenz ich v. a. während meiner Anfangszeit profitieren durfte. Bei Dr. Anja Richter möchte ich mich für ihre Zeit des Korrekturlesens bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt Alex, die mir nicht nur hilfreich im Labor zur Seite stand (v. a. zu unmenschlich frühen Tageszeiten), sondern mir auch viele ferne Länder als zukünftige Reiseziele schmackhaft gemacht hat. Für eine tolle Arbeitsatmosphäre und viel Gelächter möchte ich insbesondere Susi, Alex, Franzi, Anja und Kim danken. Diese Zeiten werde ich definitiv vermissen!

Der gesamten AG Hengge sowie den Mitgliedern der AG Eitinger und AG Tschowri danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und zahlreiche lustige Gesprächsrunden, wodurch ich auf eine lehrreiche Zeit mit Freude zurückblicken werde.

Für die anhaltende Unterstützung und motivierende Worte möchte ich mich auch herzlich bei meiner Familie – insbesondere meiner Mutter - und Freunden bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis.....	vii
Abkürzungen.....	viii
Zusammenfassung	x
Summary	xii
1. Einleitung.....	1
1.1 Physiologische Differenzierung von <i>Escherichia coli</i>.....	1
1.1.1 Biofilme - komplexe heterogene Lebensgemeinschaften	1
1.1.2 Genexpression beim Übergang von exponentiellem zu stationärem Wachstum	2
1.1.3 Das Signalmolekül c-di-GMP.....	5
1.1.3.1 Auf- und Abbau von c-di-GMP über DGCs und PDEs.....	6
1.1.3.2 Vielfalt an GGDEF-/EAL-Domänenproteinen und Effektoren.....	7
1.1.3.3 Globale vs. lokale c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion.....	11
1.1.4 Kontrollnetzwerk und Synthese von Matrixkomponenten in <i>E. coli</i>	12
1.2 Physiologische Differenzierung bedingt die Biofilmarchitektur.....	17
1.2.1 Mikroskopischer Aufbau eines <i>E. coli</i> Biofilms	18
1.2.2 Makroskopische Ausprägungen von <i>E. coli</i> Biofilmen	19
1.3 DgcE als Master-DGC der Matrixproduktion.....	21
1.3.1 DgcE – ein Multidomänenprotein.....	21
1.3.2 DgcE als Schlüsselkomponente der Matrixsynthese	22
2 Zielsetzung.....	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Geräte	26
3.2 Chemikalien.....	26
3.3 Nährmedien	27
3.3.1 Flüssigmedien.....	27
3.3.2 Festmedien	28
3.3.3 Antibiotikazusätze	29
3.4 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	29
3.4.1 Bakterienstämme	29
3.4.2 Bakteriophagen.....	34
3.4.3 Plasmide	34

3.5	Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	37
3.5.1	Sterilisation	37
3.5.2	Bakterienkultivierung	37
3.5.3	Bestimmung der bakteriellen Zelldichte	37
3.5.4	Aufbewahrung von Bakterienstämmen	38
3.5.5	Herstellung eines P1-Lysates	38
3.5.6	P1-Transduktion	38
3.5.7	Analyse von Biofilmbildung auf Festmedien (Makrokolonien)	39
3.6	DNA-basierte Methoden für Klonierungen und chromosomale Mutationen.....	39
3.6.1	Isolierung chromosomaler DNA.....	39
3.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	39
3.6.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA.....	39
3.6.4	DNA-Oligonukleotide	40
3.6.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
3.6.6	Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt PCR	46
3.6.7	Agarosegelelektrophorese	47
3.6.8	Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel	47
3.6.9	Restriktionsverdau	48
3.6.10	Ligation	48
3.6.11	TSS-Transformation	48
3.6.12	Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	49
3.6.13	Elektrotransformation.....	49
3.6.14	Erzeugung chromosomaler Gendelektionen mittels Ein-Schritt-Inaktivierung.....	50
3.6.15	Erzeugung von chromosomalen Punktmutationen und Deletionen einzelner Proteindomänen mittels Zwei-Schritt- Inaktivierung	50
3.6.16	Erzeugung chromosomaler 3xFLAG-Fusionen	51
3.6.17	Sequenzierungen.....	52
3.7	Protein-basierte Methoden	52
3.7.1	Proteinextraktion aus Bakterienzellen	52
3.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.7.3	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	53
3.7.4	Immunoblotanalyse (Westernblot)	53
3.7.5	Protein-Interaktionsstudien (Bacterial-Two-Hybrid-Assay)	54
3.8	RNA-basierte Methoden	55
3.8.1	RNA-Extraktion aus Bakterienzellen.....	55
3.8.2	Northernblotanalyse.....	55
3.9	Enzym- und Extraktionsmethoden.....	57
3.9.1	β -Galaktosidase-Aktivitätstest	57
3.9.2	Extraktion von c-di-GMP zur Konzentrationsbestimmung	58
3.10	Datenbanken und computergestützte Analysen	59

4	Ergebnisse	60
4.1	Regulation und Wirkungsweise der Diguanylatzyklase DgcE	60
4.1.1	Einfluss einzelner DgcE-Domänen auf die Synthese der Biofilmmatrix	60
4.1.1.1	Erzeugung verschiedener chromosomaler <i>dgcE</i> -Mutanten	60
4.1.1.2	DgcE-Aktivität erfordert die TM-, PAS- und GGDEF-Domänen, die EAL _{deg} -Domäne wirkt ihr entgegen	61
4.1.1.3	Dimerisierung von DgcE wird durch die PAS-Domänen vermittelt	64
4.1.2	Proteolyse von DgcE	66
4.1.2.1	DgcE wird in sämtlichen Wachstumsphasen abgebaut	66
4.1.2.2	Proteolyse und Aktivierung von DgcE erfordern seine TM-Region	67
4.1.2.3	Überexpression von DgcE resultiert in verminderter DgcE-Proteolyse	71
4.1.2.4	Analyse von potentiellen an der DgcE-Proteolyse beteiligten Proteasen	73
4.1.3	Regulation der DgcE-Aktivität durch YjdA und YjcZ	75
4.1.3.1	DgcE-vermittelte Matrixsynthese erfordert YjdA und YjcZ	76
4.1.3.2	YjdA und YjcZ wirken weder auf die Proteolyse noch auf die inhibitorische EAL _{deg} -Domäne von DgcE ein	77
4.1.3.3	DgcE, YjdA und YjcZ bilden einen Proteinkomplex	78
4.1.3.4	YjdA interagiert mit der TM-Region von DgcE	80
4.1.3.5	GTPase-Aktivität von YjdA ist notwendig für die Matrixsynthese und Komplexbildung mit DgcE	81
4.1.3.6	DgcE/YjdA/YjcZ regulieren das PdeR/DgcM/MlrA-Modul nicht ausschließlich über die DGC-Aktivität von DgcE	85
4.1.3.7	Ist PdeR durch Proteininteraktionen mit DgcE und YjdA assoziiert ?	87
4.1.4	Analyse der TM-Domäne von DgcE	90
4.1.4.1	Eine chromosomale <i>dgcE</i> ^{ΔMASE1} -Mutante zeigt eine reduzierte Matrixsynthese	90
4.1.4.2	Überexprimiertes DgcE ^{ΔMASE1} erzeugt einen von c-di-GMP und YjdA- YjcZ unabhängigen Δ <i>pdeR</i> -ähnlichen Phänotypen	91
4.2	Analyse von neu identifizierten Curli-Kontrollgenen	95
4.2.1	RbsK, RbsR, YdcI, YieP und PuuR greifen nicht in die PdeR/DgcM/MlrA-vermittelte <i>csgD</i> -Expression ein	96
4.2.2	RbsK, RbsR, YdcI, YieP und PuuR wirken nicht auf Zellhüllstress-vermittelte <i>csgD</i> -Inhibition ein	98
4.3	Einfluss von mechanischen, durch Flagellenverknötung bewirkten Signalen auf die Biofilmmatrixsynthese	100
4.3.1	Rotationsbedingte flagellare Verknötungen stellen ein Signal für die Matrixproduktion dar	100
4.3.2	Nimmt DgcE verknötete Flagellen als Signal wahr?	102
4.3.2.1	DgcE beeinflusst die Biofilmmatrixsynthese stärker auf Fest- als in Flüssigmedium	102
4.3.2.2	DgcE ist nicht an der Wahrnehmung flagellarer Verknötungen beteiligt	104
4.3.3	Flagellare Verknötungen resultieren in reduzierter <i>pdeH</i> - Expression	106

5	Diskussion	108
5.1	DgcE integriert multiple Signale über diverse Domänen.....	108
5.1.1	Bedeutung der GGDEF- und PAS-Domänen für die DGC-Aktivität und Dimerisierung.....	108
5.1.2	EAL _{deg} -vermittelte Inhibition der aktivierenden Di- bzw. Oligomerisierung	110
5.1.3	MASE1-umfassende TM-Region mit aktivierenden und inhibierenden Rollen	112
5.2	Proteolyse von DgcE.....	114
5.3	DgcE-Aktivitätskontrolle durch ein GTPase-System	116
5.4	Lokale Signaltransduktion der DgcE-vermittelten Regulation des PdeR/DgcM/MlrA- Moduls	120
5.5	Modell der DgcE-vermittelten Matrixexpression	122
5.6	Neue Regulatoren der <i>E. coli</i> Biofilmbildung.....	125
5.7	Flagellare Verknotungen als Signal der c-di-GMP- vermittelten Matrixexpression	128
6	Referenzen	132
	Selbstständigkeitserklärung.....	148

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1:	Einfaches c-di-GMP-Kontrollmodul.....	5
Abb. 2:	Kontrollnetzwerk extrazellulärer Matrixkomponenten in <i>E. coli</i>	14
Abb. 3:	Physiologische Differenzierung erzeugt eine 3-schichtige Biofilmarchitektur.....	19
Abb. 4:	Phänotypische Ausprägung von <i>E. coli</i> Makrokolonien in Abhängigkeit exprimierter Matrixkomponenten.....	20
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Diguanylatzyklase DgcE.....	22

Ergebnisse – Regulation und Wirkungsweise der Diguanylatzyklase DgcE

Abb. 6:	Kodierte Proteindomänenstrukturen der hergestellten chromosomalen <i>dgcE</i> - Mutanten.....	61
Abb. 7:	Die GGDEF-vermittelte Zykaseaktivität sowie die sensorischen TM- und PAS-Domänen sind notwendig für DgcE-vermittelte Biofilmmatrix- synthese, wohingegen die EAL _{deg} -Domäne dieser entgegenwirkt.....	63
Abb. 8:	DgcE-Dimerisierung wird vornehmlich über die PAS-Domänen vermittelt.....	65
Abb. 9:	DgcE unterliegt in sämtlichen Wachstumsphasen einer massiven Proteolyse.....	67
Abb. 10:	Funktionalität, Expression und Proteolysemuster sämtlicher chromosomal kodierter 3xFLAG-markierter DgcE-Varianten.....	69
Abb. 11:	Zuordnung der EAL _{deg} -Abbaubande im Proteolysemuster von DgcE::3xFLAG.....	70
Abb. 12:	DgcE-Aktivität erfordert DgcE-eigene Transmembrandomänen.....	70
Abb. 13:	Expression und Proteolysemuster sämtlicher plasmidkodierter DgcE-Varianten...	72
Abb. 14:	Überexpression von DgcE resultiert in verminderter Prozessierung des DgcE-Proteins.....	72
Abb. 15:	Analyse von potentiellen an der DgcE-Proteolyse beteiligten Proteinen.....	74
Abb. 16:	Analyse der Beteiligung von FtsH, YhjJ, PtrA und PqqL an der DgcE-Proteolyse.	75
Abb. 17:	YjdA und YjcZ beeinflussen c-di-GMP-vermittelte Biofilmmatrixproduktion über DgcE.....	76
Abb. 18:	YjdA und YjcZ wirken weder auf die EAL _{deg} -Domäne noch die Proteolyse von DgcE ein.....	78
Abb. 19:	DgcE, YjdA und YjcZ formen einen Proteinkomplex.....	79
Abb. 20:	YjdA ist in sämtlichen Wachstumsphasen in der Zelle vorhanden.....	80
Abb. 21:	YjdA interagiert mit der TM-Region von DgcE.....	81
Abb. 22:	Die Expression von GTPase-defizientem YjdA ^{T103D} ist nicht verändert.....	82
Abb. 23:	Die GTPase-Aktivität von YjdA ist essentiell für die Expression der Biofilmmatrix.	83
Abb. 24:	GTPase-defizientes YjdA ^{T103D} bewirkt eine gestörte Komplexbildung mit DgcE....	84

Abb. 25: Die Überexpression von DgcE erzeugt einen von YjdA-YjcZ unabhängigen Cellulose-überproduzierenden Phänotypen aufgrund stark erhöhter zelluärer c-di-GMP-Konzentrationen.....	86
Abb. 26: Die Überexpression von DgcE wirkt sich in <i>dgcE</i> - und <i>yjdA-yjcZ</i> -Deletionsmutanten kaum auf die Curli-Expression aus.....	86
Abb. 27: PdeR interagiert nicht direkt mit DgcE, könnte aber über eine Interaktion mit YjdA mit DgcE assoziiert sein.....	89
Abb. 28: Eine chromosomale <i>dgcE</i> ^{ΔMASE1} -Mutante ist in seiner Biofilmmatrixsynthese reduziert und weist vergleichsweise geringe zelluläre Proteinmengen auf.....	90
Abb. 29: Plasmidkodiertes DgcE ^{ΔMASE1} ::6His erzeugt einen Δ <i>pdeR</i> -ähnlichen Phänotypen.	93
Abb. 30: Plasmidkodiertes DgcE ^{ΔMASE1} ::6His erzeugt einen c-di-GMP-unabhängigen Δ <i>pdeR</i> -ähnlichen Phänotypen.....	93
Abb. 31: Der durch plasmidexprimiertes DgcE ^{ΔMASE1} ::6His erzeugte Δ <i>pdeR</i> -ähnliche Phänotyp ist unabhängig von YjdA-YjcZ.....	94

Ergebnisse – Analyse von neu identifizierten Curli-Kontrollgenen

Abb. 32: Analyse von z. T. neu identifizierten biofilmrelevanten Genen.....	97
Abb. 33: Keines der identifizierten Genprodukte greift in die Zellhüllstress-vermittelte Inhibition der <i>csgD</i> -Expression ein.....	99

Ergebnisse – Einfluss von mechanischen, durch Flagellenverknötung bewirkten Signalen auf die Biofilmmatrixsynthese

Abb. 34: Die Inhibition der Flagellenrotation (Δ <i>motA</i>) resultiert in verminderter Biofilmmatrixproduktion, die durch die Deletion von <i>pdeH</i> kompensiert werden kann.....	101
Abb. 35: DgcE ist für die Curli-Expression auf Festmedium von größerer Bedeutung als in Flüssigmedium.....	103
Abb. 36: DgcE agiert unabhängig von rotationsbedingter Flagellenverknötung.....	105
Abb. 37: Die Inhibition der Flagellenrotation (Δ <i>motA</i>) resultiert spezifisch auf Festmedium in erhöhter <i>pdeH</i> -Expression.....	107

Diskussion

Abb. 38: Modell der Aktivitätskontrolle von DgcE.....	122
Abb. 39: Hypothese der Auswirkung von flagellaren Verknötungen als Signal der c-di-GMP-vermittelten Biofilmmatrixsynthese.....	130

Tabellenverzeichnis

Einleitung

Tab. 1:	Domänenarchitektur sämtlicher 29 GGDEF-/EAL-Domänenproteine in <i>E. coli</i> K12.....	9
----------------	---	---

Material und Methoden

Tab. 2:	Geräte und Apparaturen.....	26
Tab. 3:	Antibiotika und deren Konzentrationen.....	29
Tab. 4:	Verwendete Bakterienstämme.....	29
Tab. 5:	Verwendete Plasmide.....	34
Tab. 6:	Verwendete Primer.....	40
Tab. 7:	Synthetisch hergestellte DNA-Fragmente.....	45
Tab. 8:	Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen für die SDS-PAGE.....	53
Tab. 9:	Primer zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden zur Detektion von RNA.....	56

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
A-site	<i>active site</i> , aktives Zentrum
bp	Basenpaare
BTH	Bacterial Two-Hybrid
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinmonophosphat
CIP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CR	<i>congo red</i> , Kongorot
CRP	<i>cAMP receptor protein</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
Cm	Chloramphenicol
d	Tag/e
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DGC	Diguanylatzyklase
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	1,4,-Dithiothreitol
EAL _{deg}	degenerierte EAL-Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
fw	<i>forward</i>
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/n
HRP	horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
I-site	<i>inhibitory site</i> , inhibitorisches Zentrum

Abkürzungen

K _d	Dissoziationskonstante
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBnoS	<i>lysogeny broth</i> ohne Salz
m	milli
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute/n
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nt	Nukleotid/e
N-terminal	Amino-terminal
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x [nm]
ONPG	ortho-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
ori	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
pEtN	Phosphoethanolamin
rev	<i>revers</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde/n
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	<i>transformation storage solution</i>
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Zusammenfassung

Das Enterobakterium *E. coli* ist in der Lage, schutzbietende Lebensgemeinschaften in Form von Biofilmen zu bilden, was mit der Synthese extrazellulärer Matrixsubstanzen (Curli-Fimbrien und pEtN-Cellulose) einhergeht und von der Expression des Biofilm-Masterregulators CsgD abhängt. Dabei ist das sekundäre Signalmolekül c-di-GMP unabdingbar. Sein Auf- und Abbau wird in *E. coli* K12 durch 12 Diguanylatzyklasen (DGCs mit GGDEF-Domänen) und 13 Phosphodiesterasen (PDEs mit EAL-Domänen) reguliert. Die global agierende Master-PDE PdeH hält die zelluläre c-di-GMP-Konzentration in wachsenden Zellen gering. Beim Eintritt in die frühe stationäre Wachstumsphase nimmt die PdeH-Proteinmenge ab, wohingegen die Aktivität einiger DGCs gesteigert wird und schließlich c-di-GMP-vermittelte *csgD*-Expression stattfinden kann.

Dabei kommt der DGC DgcE (früher YegE) eine Hauptrolle zu, indem sie der inhibitorischen Wirkung der Trigger-PDE PdeR auf die *csgD*-Transkriptionsaktivatoren DgcM und MrA entgegenwirkt. DgcE ist die strukturell komplexeste DGC in *E. coli* K12 und wird über zehn N-terminale Transmembrandomänen (TM) in der inneren Zellmembran verankert, wobei die ersten acht zu Beginn dieser Arbeit als MASE1-Domäne annotiert waren. An die TM-Region schließen sich drei PAS/PAC-Domänen, eine GGDEF- und eine degenerierte EAL-Domäne (EAL_{deg}) an. Die Vielzahl an Domänen sowie die Bedeutung von DgcE für die Biofilmmatrixsynthese lassen auf eine komplexe Signalintegration und -transduktion schließen.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, einzelne DgcE-Domänen mit aktivierenden bzw. inhibierenden Eigenschaften hinsichtlich der Biofilmmatrixsynthese zu assoziieren. Die *csgD*-Expression und Matrixproduktion hängen u. a. von DgcE-produziertem c-di-GMP ab, wobei die GGDEF-Domäne DGC-Aktivität verleiht und die PAS-Domänen an der hierfür nötigen Dimerisierung von DgcE beteiligt sind. Der EAL_{deg}-Domäne kommt eine inhibierende Rolle zu, indem sie vermutlich die Di- bzw. Oligomerisierung von DgcE verhindert.

Da selbst eine deutlich erhöhte zelluläre c-di-GMP-Konzentration während der Überexpression von DgcE nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Curli-Expression korrelierte, reguliert DgcE das PdeR/DgcM/MrA-Modul neben seiner DGC-Aktivität wahrscheinlich auch über lokale Signaltransduktion - vermutlich über interaktionsbasierte PdeR-Rekrutierung.

Die DgcE-vermittelte Matrixproduktion bedarf zudem der Aktivierung seitens der GTPase YjdA und ihrem Partnerprotein YjcZ. Über direkte Interaktionen mit YjcZ und der TM-Region von DgcE vermittelt YjdA eine Komplexbildung. Die Interaktion von YjdA und DgcE sowie die Matrixproduktion hängen von der GTPase-Aktivität von YjdA ab, da beides in einer *yjdA*^{T103D}-Mutante (GTP-Bindung ohne Hydrolyse) gestört war. GTP wird daher als intrazelluläres Signal vorgeschlagen, welches in wachsenden Zellen die Aktivierung von DgcE durch YjdA inhibiert. Erst bei sinkenden GTP-Konzentrationen in der Stationärphase könnte somit die Aktivierung von DgcE und folglich die *csgD*- und Matrixexpression begünstigt werden.

Die MASE1-umfassende TM-Region entpuppte sich als Zentrale der Signalintegration. Einerseits ist die gesamte TM nötig für die DgcE-Aktivität und andererseits ist sie an einem massiven Abbau von DgcE in sämtlichen Wachstumsphasen beteiligt. So gelang es im Rahmen dieser Arbeit, die bislang kaum untersuchte MASE1-Domäne hinsichtlich ihrer Funktionalität und Signalintegration erstmals näher zu beschreiben.

Im Vorfeld dieser Dissertationsarbeit hat die Arbeitsgruppe um Dr. A. Typas (EMBL, Heidelberg) bislang unbekannte Curli-regulierende Gene in *E. coli* identifiziert, die im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirkposition innerhalb der Biofilmmatrixkontrollkaskade analysiert wurden. Keines dieser Genprodukte greift jedoch wie DgcE, YjdA und YjcZ über das PdeR/DgcM/MlrA-Modul in die c-di-GMP-vermittelte *csgD*-Expression ein.

Flagellare Verknotungen in der unteren Schicht von *E. coli* Makrokolonien tragen zur Morphogenese von *E. coli* Makrokolonie-Biofilmen bei. Dies legt die Vermutung nahe, dass solche Verknotungen ein mechanisches Signal generieren, welches die Matrixsynthese in oberen Schichten aktiviert.

Die Integration dieses Signals in die Matrixkontrollkaskade wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Es zeigte sich, dass das Transmembranprotein DgcE mit seiner sensorischen MASE1-Domäne nicht direkt an der Wahrnehmung flagellarer Verknotungen beteiligt ist. Vielmehr weisen die Daten darauf hin, dass Flagellenverknotungen zu einer verminderten Expression der Master-PDE PdeH beizutragen, wodurch vermutlich die zelluläre c-di-GMP-Konzentration steigt und somit die Biofilmbildung begünstigt wird.

Insgesamt führte diese Arbeit zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Signalintegration und -transduktion beim Übergang von der flagellaren hin zur Biofilmmatrix-bildenden Kontrollkaskade in *E. coli* K12.

Summary

The enterobacterium *E. coli* is capable of forming multicellular communities that are characterized by the synthesis of extracellular matrix components (curli fibres and pEtN-cellulose) and enhanced stress resistance. The formation of such biofilms is promoted by the master regulator CsgD. The expression of *csgD* depends on the second messenger c-di-GMP, which in *E. coli* K12 is produced by 12 diguanylate cyclases (DGCs with GGDEF domains) and degraded by 13 phosphodiesterases (PDEs with EAL domains). In growing cells the globally acting master PDE PdeH keeps the cellular c-di-GMP concentration low. During entry into the early stationary growth phase PdeH protein levels decrease while the activities of several DGCs increase, finally resulting in c-di-GMP mediated *csgD* expression. The DGC DgcE (formerly known as YegE) serves as a top-level trigger during this process by counteracting the trigger PDE PdeR, which has an inhibitory impact on the *csgD* transcriptional activators DgcM and MlrA. DgcE is the most complex DGC in *E. coli* K12 and is integrated into the inner cell membrane via 10 N-terminal transmembrane domains (TM) with the first 8 being annotated as a MASE1 domain when this study was started. The TM is followed by 3 PAS/PAC domains, a GGDEF domain and a degenerate EAL domain (EAL_{deg}). The variety of domains as well as the pivotal role of DgcE for biofilm matrix synthesis suggest complex signal integration and transmission through DgcE.

In the context of this work it was possible to assign activating and inhibitory roles to single domains of DgcE in the expression of biofilm matrix. C-di-GMP produced by DgcE is necessary for *csgD* expression and matrix production. While the GGDEF domain confers DGC activity, the PAS domains are involved in the necessary dimerization of DgcE. The EAL_{deg} domain plays an inhibitory role by presumably destabilizing di- or oligomerization of DgcE.

Since a drastic increase in the cellular c-di-GMP concentration due to DgcE overexpression was not necessarily accompanied by enhanced curli expression, DgcE regulates the PdeR/DgcM/MlrA module not only by its DGC activity but most likely also by local signal transduction – which possibly involves an interaction-based recruitment of PdeR.

Furthermore, DgcE-mediated matrix synthesis requires the activating signal input of the GTPase YjdA and its partner protein YjcZ. DgcE, YjdA and YjcZ form a protein complex, in which YjdA directly interacts with YjcZ and the TM region of DgcE. The interaction between YjdA and DgcE as well as the biofilm matrix production depend on the GTPase activity of YjdA, since both was impaired in a *yjdA*^{T103D} mutant (GTP binding without GTP hydrolysis). Thus, it is proposed that GTP serves as an intracellular signal, which inhibits the activation of DgcE by YjdA in growing cells. Decreasing GTP levels during entry into stationary phase could thus allow for DgcE activation and finally *csgD* and matrix expression.

The TM region of DgcE, which contains the MASE1 domain, proved to be a central hub for signal integration. The entire TM region is required for DgcE activity as well as for the massive degradation of DgcE throughout the growth cycle. These data represent the first insight into the function and signal input of the so far uncharacterized MASE1 domain.

Prior to this work, the research group of Dr. A. Typas (EMBL, Heidelberg) was able to identify novel genes, that control the expression of amyloid curli fibres in *E. coli* macrocolonies.

In order to determine their role within the biofilm matrix control network, these genes were analyzed in more detail here. However, none of the identified gene products act on *csgD* expression via the PdeR/DgcM/MlrA module like DgcE, YjdA and YjcZ.

Flagellar entangling within the bottom layer of *E. coli* K12 macrocolonies was observed to promote morphogenesis of macrocolony biofilms of *E. coli*, suggesting that such entangling might generate a mechanical signal, which stimulates matrix expression in the upper biofilm layers. In this study, the integration of this signal was investigated further. It turned out that DgcE (containing a transmembrane MASE1 domain) does not sense flagellar entangling directly. However, the data suggest that the master PDE PdeH is somehow down-regulated by flagellar entangling, which probably results in a higher cellular c-di-GMP concentration, thereby promoting biofilm formation.

In conclusion, this work has provided important novel insights regarding the signals and signal-transducing components during the transition from the flagellar to the biofilm matrix producing control cascade in *E. coli* K12.

1. Einleitung

1.1 Physiologische Differenzierung von *Escherichia coli*

Mikroorganismen sind in der Lage, unterschiedlichste Habitate zu besiedeln und Änderungen ihrer Umwelt mit schnellen zellulären Anpassungsstrategien zu begegnen. Solche Prozesse gehen häufig mit veränderten Lebensstilen einher. So lässt sich bei dem gram-negativen fakultativ anaeroben Enterobakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) die einzellige durch Motilität geprägte planktonische Existenz von der innerhalb eines mehrzelligen sessilen Aggregats unterscheiden. Letzterer Lebensstil ist in der Natur bei weitem häufiger anzutreffen und wird als Biofilm bezeichnet (Costerton et al., 1987). Eine solche Lebensgemeinschaft zeichnet sich durch eine hohe strukturelle Komplexität aus, die durch umweltbedingte physiologische und morphologische Differenzierung der Zellen innerhalb des Biofilms bedingt ist. Für *E. coli* gehören dabei Flagellen sowie extrazelluläre Matrixkomponenten zu den strukturellen Hauptmerkmalen. Die Expression dieser Bestandteile erfolgt mittels invers regulierter Signalkaskaden und beruht auf alternierender Genexpression in unterschiedlichen Wachstumsphasen. Dies erfordert eine akkurate Koordination der Expression notwendiger Gene, wobei die Regulation solch selektiver Genexpression hoch komplexen Signalkaskaden unter Beteiligung unterschiedlicher Sigmafaktoren (σ), Transkriptionsfaktoren und sekundärer Botenstoffe unterliegt. Die hierbei zugrunde liegenden molekularen Mechanismen werden im Folgenden zusammengefasst.

1.1.1 Biofilme - komplexe heterogene Lebensgemeinschaften

Biofilme können sich auf nahezu jeder Oberfläche entwickeln und bestehen entweder aus einer einzigen oder mehreren Spezies. Sie sind von einer selbstproduzierten extrazellulären Matrix umgeben, die je nach Spezies und Umweltbedingung aus Proteinen, Polysacchariden und extrazellulärer DNA zusammengesetzt ist. Diese Matrix verleiht neben adhäsiven und stabilisierenden Eigenschaften eine verstärkte Resistenz gegenüber einer Vielzahl an Stressfaktoren (Flemming et al., 2016). Hierzu gehört nicht nur der erhöhte Schutz gegen Fressfeinde, UV-Strahlung oder Austrocknung, sondern auch solcher gegenüber Antibiotika, das Immunsystem und Desinfektionsmittel (Hall and Mah, 2017; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009; Hoiby et al., 2010). Die daraus resultierende medizinische und technologische Relevanz hat ein verstärktes Interesse an der Untersuchung von Biofilmen hervorgerufen. Aber auch biofilmvermittelte positive Eigenschaften für den menschlichen Organismus, wie beispielsweise Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen im Darm (Jandhyala et al., 2015), machen den bakteriellen Biofilm zu einem interessanten Studienobjekt.

Die Entstehung eines Biofilms wird durch planktonische Zellen initiiert, die mittels Oberflächenadhäsinen und Fimbrien sowohl Zell-Oberflächen- als auch Zell-Zell-Kontakte herstellen und somit zunächst Mikrokolonien ausbilden. Über einen komplexen Reifungsprozess, der mit physiologischer Differenzierung und Matrixproduktion einher geht, entsteht letztlich ein reifer Biofilm, von dem sich einzelne Zellen ablösen und als planktonische Zellen neue Nahrungsquellen erschließen können (O'Toole et al., 2000). Je nach Beschaffenheit der Oberflächenstruktur und der Verfügbarkeit von Nährstoffen, Sauerstoff und Wasser unterscheidet man zwischen vier Biofilmtypen. (i) Ein **submerser Biofilm** wächst auf einer festen inerten Oberfläche und ist von einer nährstoff- sowie sauerstoffhaltigen Flüssigkeit umgeben. (ii) **Subaeriale Biofilme** hingegen beziehen Nährstoffe, Sauerstoff und Wasser aus der sie umgebenden Luftatmosphäre und wachsen auf festen Oberflächen, die zudem Mikro-Nährstoffe enthalten können. (iii) Ein **Pellicle** wächst auf einer Luft-Flüssigkeit-Grenzfläche und erhält seine Nährstoffe aus der flüssigen Phase. (iv) Ein **Makrokolonie-Biofilm** wächst auf einer nährstoffreichen festen Oberfläche und bezieht Sauerstoff aus der ihn umgebenden Luftatmosphäre (Serra and Hengge, 2014).

Diese Dissertation stützt sich auf Daten, die auf der Analyse des gut untersuchten Laborstammes *E. coli* K12 beruhen, wobei dessen Biofilmbildung mithilfe von Makrokolonien veranschaulicht wurde. Daher werden im Folgenden zunächst die Charakteristika sowie Regulationsprozesse von physiologischer Differenzierung vorwiegend anhand von *E. coli* erläutert. Die daraus resultierende Biofilmarchitektur in Form von Makrokolonien wird in Kapitel 1.2 verdeutlicht.

1.1.2 Genexpression beim Übergang von exponentiellem zu stationärem Wachstum

Das Enterobakterium *E. coli* weist klar voneinander unterscheidbare physiologische Stadien auf (Pesavento et al., 2008). Umfangreiche Analysen des bakteriellen Wachstums - definiert als die Zunahme der Zellzahl durch Zellteilung - anhand von *E. coli* in dem komplexen Flüssigmedium Lysogeny broth (LB) haben zur Abgrenzung zeitlich aufeinanderfolgender Wachstumsphasen beigetragen, die auch in Makrokolonien entlang räumlich bedingter Gradienten wiederzufinden sind (vgl. 1.2.1). Diese Phasen unterscheiden sich zum einen in der Wachstumsgeschwindigkeit und zum anderen in der Genexpression, die u. a. durch alternierende Aktivitäten von Sigmafaktoren (σ) reguliert wird (Klauck et al., 2018; Sezonov et al., 2007).

Die RNA-Polymerase (RNAP) interagiert als Kernenzym mit **Sigmafaktoren**, die spezifische Promotorsequenzen erkennen und binden. Dies führt dazu, dass das Holoenzym ($E\sigma$ =

RNAP + σ -Faktor) die Transkription von Sigmafaktor-spezifischen Regulons einleitet. Neben dem vegetativen Faktor σ^{70} (RpoD), der den Grundstoffwechsel in wachsenden Zellen ermöglicht, existiert mit σ^S (RpoS) ein weiterer global wirkender Sigmafaktor, der die für die generelle Stressantwort notwendige Genexpression in der stationären Wachstumsphase bewirkt (Lange and Hengge-Aronis, 1991b; Weber et al., 2005). Zudem verfügt *E. coli* über weitere alternative Sigmafaktoren, die bei spezifischen Stressantworten eine Rolle spielen. σ^{FliA} (FliA) wird für die Expression flagellarer Gene benötigt, während σ^{32} (RpoH) bei Hitzestress, σ^{54} (RpoN) bei Stickstoffmangel, σ^E (RpoE) bei Zellhüllstress und σ^{19} (RpoI) bei Eisentransport aktiviert werden (Storz and Hengge, 2011). Dadurch, dass Sigmafaktoren abhängig von den herrschenden Umweltbedingungen exprimiert werden, miteinander um die Bindung an eine limitierte Anzahl an RNAP konkurrieren und andere Sigmafaktoren gegebenenfalls austitrieren, wird eine ständige Regulation der Genexpression gewährleistet. Hinzu kommen Anti-Sigmafaktoren, welche die Aktivität bestimmter Sigmafaktoren spezifisch inhibieren können (Grigorova et al., 2006; Ishihama, 2000).

Nach der Anpassung des *E. coli* Stoffwechsels beim Wachstum in LB während einer kurzen Anlaufphase, erfolgt zunächst eine Phase schnellen Wachstums, die von ribosomaler Genexpression dominiert wird und mit hohen zellulären Konzentrationen an Energieträgern wie ATP und GTP einhergeht (Buckstein et al., 2008). Hierbei ist **exponentielles Wachstum** - bis zu einer optischen Dichte bei 578 nm (OD_{578}) von 0,3 mit einer Verdopplungszeit von etwa 20 min bei 37°C - von frühem postexponentiellem Wachstum zu unterscheiden. Die Verknappung von Energiequellen und die damit verbundene verringerte Wachstumsrate leitet ab einer $OD_{578} \approx 2$ spätes **postexponentielles Wachstum** ein. Die Zellen beginnen neben der Expression verbesserter Metabolit-Transportsysteme auch Flagellen auszubilden, was aufgrund vermehrter Motilität das aktive Aufsuchen neuer Nahrungsquellen erlaubt (Amsler et al., 1993; Ferenci, 2001; Liu et al., 2005). Vermittelt werden diese Prozesse durch ansteigende zelluläre Konzentrationen der sekundären Botenstoffe cAMP und (p)ppGpp.

Die Bindung von **cAMP** an den Transkriptionsaktivator CRP (*cAMP receptor protein*) bewirkt u. a. die Expression einer Reihe von Genen, die bei der Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen zum Tragen kommen. Zudem steht die Transkriptionseinheit *flhDC* unter der Expressionskontrolle von cAMP-CRP. Dieses flagellare Klasse 1 Operon kodiert für den heterohexamerischen Proteinkomplex FlhDC, der an der Spitze der **flagellaren Regulationskaskade** steht und somit als Masterregulator die Flagellensynthese und Motilität einleitet (Chilcott and Hughes, 2000; Shimada et al., 2011; Soutourina et al., 1999). FlhDC aktiviert die σ^{70} -abhängige Expression der flagellaren Klasse 2 Gene. Hierzu gehören v. a. solche, die für die Morphogenese des Basalkörpers vonnöten sind, aber auch regulatorische Gene, die für σ^{FliA} sowie seinen Anti-Sigmafaktor FlgM kodieren. FlgM inhibiert σ^{FliA} bis zur Fertigstellung des Basalkörpers, durch welchen FlgM schließlich aus der Zelle heraus

exportiert wird. Der nun aktive Sigmafaktor σ^{FliA} leitet die Expression von flagellaren Klasse 3 Genen ein. Neben FliC, welches die Flagellenuntereinheit darstellt, kommt es nun zur Synthese von motilitätsverleihenden Motor- (MotA und MotB) und Chemotaxisproteinen (CheA und CheY) (Ohnishi et al., 1992; Soutourina and Bertin, 2003). Das Klasse 3 Regulon umfasst zudem u. a. die Phosphodiesterase (PDE) PdeH (früher YhjH) sowie das Protein YcgR, die beide bei der Umstellung auf extrazelluläre Matrixsynthese bei sich weiter verschlechternden Nährstoffbedingungen eine wichtige Rolle einnehmen (Ko and Park, 2000; Pesavento et al., 2008) (vgl. 1.1.4).

Die flagellare Expression wird begleitet von zunehmender **(p)ppGpp**-Synthese, wobei mithilfe der Proteine RelA und SpoT ein Pyrophosphat von ATP auf GDP (ppGpp) oder GTP (pppGpp) übertragen wird. Während SpoT sowohl am Auf- als auch Abbau von (p)ppGpp beteiligt ist, hat RelA lediglich synthetisierende Eigenschaften inne (Hauryliuk et al., 2015). Durch direkte Bindung von (p)ppGpp an die RNAP wird ribosomale Genexpression heruntergefahren und die sogenannte stringente Antwort eingeleitet, die erhöhte Stressresistenz bedingt (Hauryliuk et al., 2015; Ross et al., 2016). Entscheidend dafür ist die stark erhöhte Expression von *rpoS* und somit des für die generelle Stressantwort erforderlichen Sigmafaktors σ^{S} . Während der postexponentiellen Phase wird σ^{S} -abhängige Genexpression jedoch noch weitestgehend durch das FlhDC-kontrollierte Genprodukt FliZ inhibiert. Über DNA-Bindung an σ^{S} -abhängige Promotoren wirkt FliZ dabei als ein globaler Repressor vieler σ^{S} -abhängiger Gene, sodass σ^{70} und σ^{FliA} die postexponentielle Genexpression dominieren (Pesavento et al., 2008; Pesavento and Hengge, 2012).

Erst bei Eintritt in die **Stationärphase** ($\text{OD}_{578} \approx 3$), ab der zelluläres Wachstum aufgrund verschlechterter Nährstoffbedingungen eingestellt wird, wird die Formation des Holoenzym $\text{E}\sigma^{\text{S}}$ durch Faktoren wie Crl (Banta et al., 2013; Pratt and Silhavy, 1998; Typas et al., 2007) und den anti- σ^{70} -Faktor Rsd (Jishage and Ishihama, 1998) begünstigt. Begleitend dazu wird die energieaufwändige Flagellensynthese herunterreguliert, indem zum einen die Expression des *flhDC*-Operons durch (p)ppGpp inhibiert wird (Lemke et al., 2009) und zum anderen bestehender FlhDC-Komplex sowie σ^{FliA} durch die ClpXP- bzw. Lon-Proteasen abgebaut werden (Barembuch and Hengge, 2007; Tomoyasu et al., 2003). Die stationäre Wachstumsphase steht demnach vornehmlich unter σ^{S} -kontrollierter Genexpression, welche mit multipler Stressresistenz und der Umstellung auf einen Erhaltungsstoffwechsel einhergeht (Hengge, 2011).

Während sich die exponentiellen und postexponentiellen Wachstumsphasen durch eine stäbchenförmige und gegebenenfalls flagellierte Zellmorphologie auszeichnen, sind stationär wachsende Zellen deutlich kleiner und von ovoider Form (Lange and Hengge-Aronis, 1991a).

Bei Wachstum unterhalb von 30°C kommt es in *E. coli* K12 zudem zur σ^S -kontrollierten Produktion von **extrazellulären Matrixkomponenten** wie Curli-Fimbrien und Phosphoethanolamin(pEtN)-Cellulose (Bokranz et al., 2005; Thongsomboon et al., 2018). Dieser Prozess wird über eine komplexe Transkriptionsfaktorkaskade vermittelt (vgl. 1.1.4). Bei der Regulation dieser Kaskade ist ein Molekül von zentraler Bedeutung, dessen Auf- und Abbau von Genprodukten abhängt, die zu einem Großteil unter der Kontrolle von σ^S stehen (Sommerfeldt et al., 2009) – zyklisches di-GMP (c-di-GMP, vgl. 1.1.3).

1.1.3 Das Signalmolekül c-di-GMP

Bis-(3',5')-zyklisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) ist ein weit verbreitetes sekundäres Signalmolekül, das 1987 erstmals als ein allosterischer Aktivator der Cellulosesynthase in *Acetobacter xylinum* beschrieben wurde (Ross et al., 1987). Während c-di-GMP bislang lediglich in wenigen eukaryotischen Organismen nachgewiesen werden konnte (Burdette et al., 2011; Chen and Schaap, 2012), sind proteinkodierende Gene, die am c-di-GMP-Metabolismus beteiligt sind, in nahezu sämtlichen Bakterienspezies anzutreffen (Galperin et al., 2001).

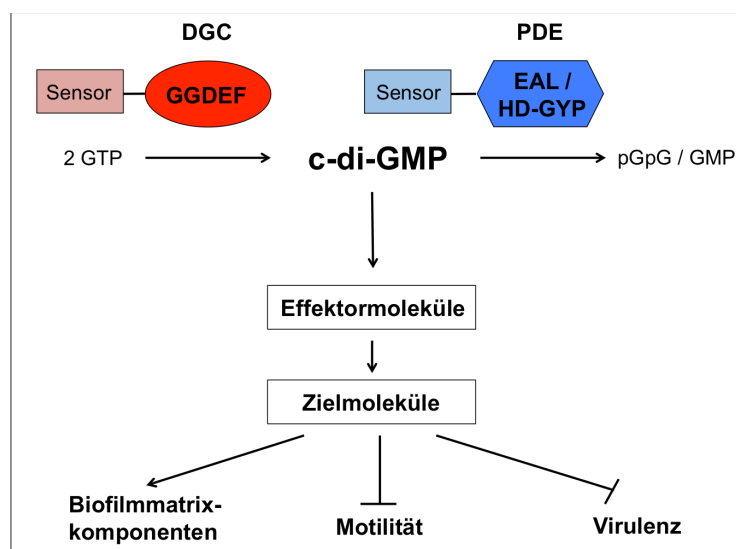


Abb. 1: Einfaches c-di-GMP-Kontrollmodul. Innerhalb eines einfachen Kontrollmoduls wird der Umsatz des Signalmoleküls c-di-GMP von mindestens einer Diguanylatzyklase (DGC) und einer Phosphodiesterase (PDE) bewerkstelligt. DGCs sind durch GGDEF-Domänen charakterisiert, die c-di-GMP aus zwei GTP-Molekülen synthetisieren. PDEs weisen entweder eine EAL- oder HD-GYP-Domäne auf, über die c-di-GMP abgebaut wird. Viele DGCs und PDEs sind mit N-terminalen Sensordomänen assoziiert, die die Integration diverser Umweltsignale erlauben. Ein breites Spektrum an Effektormolekülen, das Proteine und RNAs umfasst, bindet c-di-GMP und reguliert daraufhin spezifische Zielmoleküle (z. B. DNA, Enzyme) bzw. -strukturen (z. B. flagellarer Basalkörper). Die c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion wirkt sich negativ auf Virulenz und flagellenvermittelte Motilität aus, wohingegen die Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten und Biofilmbildung begünstigt werden.

Ein einfaches c-di-GMP-Kontrollmodul funktioniert nach dem für sekundäre Signalmoleküle typischen Prinzip (Abb. 1). Beteiligt sind mindestens eine Diguanylatzyklase (DGC) und eine Phosphodiesterase (PDE), die den Auf- bzw. Abbau von c-di-GMP bewerkstelligen. Reguliert wird deren enzymatische Aktivität in der Regel mittels N-terminaler Sensordomänen, über welche intra- und extrazelluläre Signale wahrgenommen werden können. Der Signaltransfer erfolgt durch die Bindung von c-di-GMP als allosterischer Regulator an Effektormoleküle, die daraufhin mit bestimmten Zielmolekülen interagieren und letztlich spezifische zelluläre Antworten generieren. In den vergangenen 30 Jahren konnte die Beteiligung von c-di-GMP an diversen zellulären Prozessen nachgewiesen werden (Bush et al., 2015; Hallez et al., 2017; Purcell and Tamayo, 2016), wozu auch ein positiver Einfluss auf biofilmfördernde adhäsive Eigenschaften bei gleichzeitiger Inhibition der flagellaren Signalkaskade gehört (Hengge, 2010; Römling et al., 2013).

1.1.3.1 Auf- und Abbau von c-di-GMP über DGCs und PDEs

Die Kondensation zweier GTP-Moleküle zu c-di-GMP erfolgt mithilfe von **DGCs**, welche durch katalytische GGDEF-Domänen charakterisiert (Abb. 1) und nur als Dimere enzymatisch aktiv sind. GGDEF-Domänen weisen ein hochkonserviertes Aminosäuremotiv (GGDEF oder GGEEF) innerhalb ihres aktiven Zentrums (A-site) auf. Zusätzlich sind ein Asparagin und zwei Asparaginsäuren für die Bindung eines GTP-Moleküls und des für die enzymatische Aktivität notwendigen Mg^{2+} konserviert (Ausmees et al., 2001; Chan et al., 2004; Paul et al., 2007). Die meisten DGCs besitzen zusätzlich eine c-di-GMP-Bindestelle (I-site), welche durch fünf Aminosäuren von der A-site getrennt ist und durch ein RxxD-Motiv gekennzeichnet ist. Diese I-site ermöglicht eine allosterische Produktinhibition, wodurch exzessiver c-di-GMP-Produktion durch aktive DGCs entgegengewirkt werden kann (Chan et al., 2004; Christen et al., 2006). Die c-di-GMP-Synthese kann demnach sowohl über die Expression und den Dimerisierungsmechanismus von DGCs reguliert werden, als auch über allosterische Produktinhibition durch die I-site.

Für den Abbau von c-di-GMP sind **PDEs** vonnöten, die entweder eine EAL- oder HD-GYP-Domäne aufweisen (Abb. 1), wobei *E. coli* ausschließlich für PDEs mit EAL-Domänen kodiert. Diese beiden Domänen sind nicht homolog und unterscheiden sich sowohl strukturell als auch mechanistisch. Während HD-GYP-Domänen c-di-GMP direkt zu 2 GMP-Molekülen abbauen können, hydrolysieren EAL-Domänen bei Mg^{2+} oder Mn^{2+} -Verfügbarkeit ihr Substrat zumeist lediglich zu dem linearen Zwischenprodukt 5'-Phosphoguanlyl-(3'-5')-Guanosin (pGpG) (Bellini et al., 2014; Christen et al., 2005; Schmidt et al., 2005). Der weitere Abbau von pGpG blieb lange Zeit unklar. Eine Studie anhand von *Pseudomonas aeruginosa* konnte jedoch kürzlich zeigen, dass die Oligonuklease Orn pGpG weiter zu GMP abbaut (Orr et al., 2015). Da auch das *E. coli* Genom für *orn* kodiert, ist ein ähnlicher Mechanismus

naheliegend. Namensgebend für die EAL-Domäne ist die charakteristische Aminosäurenabfolge EALxR oder EVLxR. Über die gesamte Domäne verteilt liegen zudem weitere hochkonservierte Aminosäuren, die an der Katalyse und Bindung von c-di-GMP sowie Metallionen beteiligt sind (Rao et al., 2008). Obwohl einige PDEs als Monomere *in vitro* zu PDE-Aktivität in der Lage sind, hat sich herausgestellt, dass viele PDEs als Dimere agieren, was mit regulatorischen Prozessen assoziiert wird (Barends et al., 2009; Schmidt et al., 2005; Sundriyal et al., 2014; Tchigvintsev et al., 2010).

1.1.3.2 Vielfalt an GGDEF-/EAL-Domänenproteinen und Effektoren

Während die Kontrollmodule der sekundären Botenstoffe cAMP und (p)ppGpp lediglich ein oder zwei Enzyme zum Auf- bzw. Abbau des Signalmoleküls beinhalten und nur ein Effektormolekül regulieren, unterscheidet sich das c-di-GMP-Kontrollmodul durch Multiplizität dieser Komponenten (Pesavento and Hengge, 2009; Povolotsky and Hengge, 2012). Erstaunlich ist sowohl die Vielzahl an GGDEF-/EAL-/HD-GYP-Proteinen, die in einer einzigen Spezies anzutreffen sind, als auch die strukturelle Komplexität vieler solcher Proteine. Das Genom von *Salmonella enterica* kodiert beispielsweise für 19 GGDEF-/EAL-Proteine, das von *E. coli* K12 für 29 (Tab. 1) und einige *Vibrio*-Spezies sogar für mehr als 50.

Ein Großteil dieser Proteine weist eine oder mehrere **sensorische Domänen** am N-Terminus auf, die eine komplexe Signalintegration erlauben (Galperin, 2004; Galperin et al., 2001). Hierzu gehören intrazelluläre Sensordomänen wie ligandenbindende PAS-Domänen, nukleotidbindende GAF-Domänen, DNA-bindende LuxR-ähnliche Domänen und lichtwahrnehmende Domänen wie die BLUF-Domäne. Membrangebundene MASE-Domänen, deren Signalwahrnehmung bisher weitestgehend ungeklärt ist, sowie periplasmatisch lokalisierte ligandenbindende CHASE-, GAPES- und CACHE-Domänen erlauben zudem die Wahrnehmung extrazellulärer Signale (Anantharaman and Aravind, 2000; Gomelsky and Klug, 2002; Hengge et al., 2016; Henry and Crosson, 2011; Ho et al., 2000; Nikolskaya et al., 2003). Anhand der CSS-Domäne von PdeC aus *E. coli* wurde kürzlich eine neue periplasmatische Sensordomäne beschrieben, die den Redoxzustand wahrnehmen kann und daraufhin eine komplexe Regulation der PDE-Aktivität bewirkt (Herbst et al., 2018).

In dieser Promotionsarbeit steht die DGC DgcE im Fokus, weshalb die in DgcE vorkommenden MASE1- und PAS-Sensordomänen hier näher erläutert werden.

Die Präsenz von **PAS-Domänen** innerhalb von signalintegrierenden und -transduzierenden Proteinen ist auch in Eukaryoten anzutreffen, v. a. aber in Bakterien und Archaeen weit verbreitet, wo sie u. a. häufig in Histidinkinasen, PDEs und DGCs vorkommen. Gekennzeichnet ist diese Domänenfamilie durch eine konservierte dreidimensionale

Struktur, über die diverse Liganden gebunden werden können. Diese können entweder als direktes Signal dienen oder als Co-Faktor die Wahrnehmung von Gasen, Redox-Zuständen oder Licht ermöglichen. Zudem wurde die PAS-Domäne in einigen Fällen als Dimerisierungsdomäne beschrieben, wodurch Protein-Protein-Interaktionen und sogar Tetramerisierungsprozesse vermittelt werden können (Henry and Crosson, 2011; Kiehler et al., 2017; Ma et al., 2008). Für den Großteil an PAS-Domänenproteinen ist das wahrgenommene Signal jedoch nach wie vor unbekannt. Häufig sind PAS-Domänen an ihrem C-Terminus mit einem PAC-Motiv assoziiert, welches vermutlich zur konservierten Domänenfaltung beiträgt (Ponting and Aravind, 1997).

Die **MASE1**(*membrane associated sensor 1*)-Domäne wurde erstmals vor 15 Jahren als membranintegrierte sensorische Domäne beschrieben, die in Cyano- und Alphaproteobakterien häufig mit Histidinkinasen assoziiert sind, während sie in Gammaproteobakterien (z. B. *E. coli*) zumeist mit GGDEF-, EAL- und PAS-Domänen kombiniert vorliegen (Nikolskaya et al., 2003). Nach wie vor gibt es bezüglich der Funktionsweise und des Signals, welches von der MASE1-Domäne wahrgenommen wird, kaum Erkenntnisse. Lediglich für die unter anaeroben Bedingungen exprimierte PDE YfgF aus dem fakultativ aeroben Enterobakterium *S. enterica* konnte gezeigt werden, dass die MASE1-Domäne an der YfgF-vermittelten Inhibition von Aspartat-Chemotaxis beteiligt ist. Die Autoren schlagen vor, dass mithilfe der membranständigen MASE1-Domäne aerobe Bedingungen und damit einhergehender oxidativer Stress wahrgenommen wird und daraufhin die H₂O₂-generierende Aspartatverwertung solange inhibiert wird, bis die Bakterien an die aeroben Bedingungen adaptiert sind (Lacey et al., 2013).

Hybridproteine können aus diversen Domänen bestehen, wobei häufig sowohl eine EAL- als auch GGDEF-Domäne in ein und demselben Protein zu finden sind (vgl. Tab. 1). Dieser Umstand erscheint aufgrund der beiden antagonistisch wirkenden Domänen zunächst paradox, bietet jedoch einen großen Spielraum für regulatorische Prozesse.

So können bifunktionale Proteine zwischen DGC- und PDE-Aktivität wechseln. Beschrieben wurde dies bisher anhand von BphG1 aus *Rhodobacter sphaeroides* und ScrC aus *Vibrio parahaemolyticus*, wobei Licht bzw. weitere Proteine als aktivitätsändernde Signale dienen (Ferreira et al., 2008; Tarutina et al., 2006).

Der bei weitem dominierende Anteil an GGDEF-EAL-Hybridproteinen verfügt jedoch entweder über GGDEF-vermittelte DGC- oder EAL-vermittelte PDE-Aktivität. Die jeweils andere Domäne ist dann aufgrund veränderter essentieller Aminosäuremotive degeneriert und enzymatisch inaktiv, kann jedoch in einigen Fällen noch Substrat binden und somit eine regulatorische Rolle übernehmen (Christen et al., 2005; Qi et al., 2011).

Hinzu kommen GGDEF-/EAL-Proteine, die keinerlei PDE- bzw. DGC-Aktivität mehr zeigen und demnach vollständig degeneriert sind. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist BluF aus *E. coli*,

welches aus einer sensorischen BLUF-Domäne gefolgt von einer degenerierten EAL-Domäne besteht. Die EAL-Domäne kann c-di-GMP weder umsetzen noch binden, ist aber durch direkte Protein-Protein-Interaktion mit einem Transkriptionsfaktor in der Lage, die Expression von Curli-Fimbrien zu reprimieren und die von Kolansäure zu aktivieren (Tschowri et al., 2009).

Tab. 1: Domänenarchitektur sämtlicher 29 GGDEF-/EAL-Domänenproteine in *E. coli* K12. Die Domänenarchitektur wurde aus (Hengge et al., 2016) übernommen. Die alten Proteinnamen sind in Klammern angegeben. Ein x bezeichnet Domänen, die aufgrund von Sequenzanalysen als inaktiv und degeneriert gelten.

Proteinname	Domänenarchitektur	Transmembranprotein
I. Diguanylatzyklasen (intakte GGDEF-Domänen)		
DgcC (YaiC)	MASE2-GGDEF	+
DgcE (YegE)	MASE1-PAS-PAS-PAS-GGDEF-xEAL	+
DgcF (YneF)	xMASE1-GGDEF	+
DgcI (YliF)	GAPES2--GGDEF	+
DgcJ (YeaJ)	GAPES1-GGDEF	+
DgcM (YdaM)	PAS-PAS-GGDEF	
DgcN (YfiN)	CHASE8-HAMP-GGDEF	+
DgcO (YddV)	Globinsensor-GGDEF	
DgcP (YeaP)	GAF-GGDEF	
DgcQ (YedQ)	CHASE7-xCACHE-GGDEF	+
DgcT (YcdT)	MASE4-GGDEF	+
DgcZ (YdeH)	CZB-GGDEF	
II. Phosphodiesterasen (intakte EAL-Domänen)		
PdeA (YfeA)	MASE1-xGGDEF-EAL	+
PdeB (YlaB)	CSS-EAL	+
PdeC (YjcC)	CSS-EAL	+
PdeD (YoaD)	CSS-EAL	+
PdeF (YfgF)	MASE1-xGGDEF-EAL	+
PdeG (YcgG)	CSS-EAL	+
PdeH (YhjH)	EAL	
PdeI (YliE)	CHASE9-xCACHE-HAMP-xGGDEF-EAL	+
PdeK (YhjK)	GAPES3-HAMP-xGGDEF-EAL	+
PdeL (YahA)	LuxR-EAL	
PdeN (Rtn)	CSS-EAL	+
PdeO (YddU)	PAS-PAS-xGAF-xGGDEF-EAL	
PdeR (YciR)	PAS-GGDEF-EAL	
III. Degenerierte GGDEF-/EAL-Domänenproteine		
BluF (YcgF)	BLUF-xEAL	
Cdgl (YeaI)	MASE4-xGGDEF	+
CsrD (YhdA)	GAPES4-xGGDEF-xEAL	+
RflP (YdiV)	xEAL	

Die Gruppe an **Effektormolekülen**, die c-di-GMP binden und daraufhin eine spezifische zelluläre Antwort generieren, umfasst eine Vielzahl an Proteinen und RNA-Strukturen. Die Tatsache, dass c-di-GMP von hoher struktureller Diversität geprägt ist und als Mono-, Di- und sogar Tetramer gebunden werden kann, trägt zu der stetig steigenden Zahl an identifizierten Effektoren bei (Chou and Galperin, 2016; Krasteva et al., 2012).

Die Transkription bzw. Translation von für bestimmte zelluläre Prozesse notwendigen Genen kann zum einen durch Riboswitches reguliert werden. Diese sind in der Regel innerhalb der untranslatierten 5'-Region (5'-UTR) von mRNAs lokalisiert und ändern in Abhängig von c-di-GMP-Bindung ihre Konformation, wodurch die Genexpression begünstigt bzw. inhibiert wird (Nelson et al., 2013; Smith and Strobel, 2011).

Zum anderen sind diverse Proteine an c-di-GMP-vermittelter Signaltransduktion beteiligt, wobei die PilZ-Domäne die am besten charakterisierte Effortorklasse darstellt. Zwei Aminosäuremotive (RxxxR & D/NxSxxG) tragen zur Bindung von jeweils einer Guaninbase von c-di-GMP bei (Benach et al., 2007). Eine daraus resultierende Konformationsänderung resultiert schließlich in direkter Protein-Protein-Interaktion des PilZ-Domänenproteins und einer Zielstruktur. Bekannte Vertreter sind beispielsweise die flagellare „Bremse“ YcgR und die regulatorische Cellulosesynthase-Untereinheit BcsA, die in *E. coli* maßgeblichen Einfluss auf die Inhibition der Motilität bzw. die Synthese von Cellulose als extrazellulären Matrixbestandteil haben (Amikam and Galperin, 2006; Boehm et al., 2010; Morgan et al., 2014; Ryjenkov et al., 2006) (vgl. 1.1.4).

Zu den Effektorproteinen gehören zudem Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch c-di-GMP-Bindung reguliert wird und die somit Motilität, Matrixsynthese sowie Virulenz beeinflussen (Baraquet and Harwood, 2013; Bush et al., 2015; Chin et al., 2010; Tschowri et al., 2014; Whitney et al., 2012).

Während GGDEF-/EAL-/HD-GYP-Domänenproteine mit c-di-GMP-bindenden Domänen assoziiert sein können, sind auch solche bekannt, die enzymatisch degenerierte GGDEF- bzw. EAL-Domänen aufweisen, über die noch c-di-GMP gebunden werden kann. Die degenerierte EAL-Domäne des Transmembranproteins LapD aus *P. fluorescens* dient z. B. als c-di-GMP-Sensor, wodurch Adhäsion vermittelt wird (Newell et al., 2009). Durch c-di-GMP-Bindung über die intakte I-site der enzymatisch inaktiven GGDEF-Domäne von PopA aus *C. crescentus* wird die Degradation des Zellzyklus-kontrollierenden CtrA-Proteins kontrolliert (Duerig et al., 2009).

Kürzlich wurden zudem sogenannte Trigger-PDEs als eine neuartige Klasse an Effektorproteinen beschrieben, mit PdeR (früher YciR) und PdeL als Vertreter (Hengge, 2016; Lindenberg et al., 2013; Reinders et al., 2016). Trigger-Enzyme sind durch Bifunktionalität charakterisiert, wobei sie die Expression verschiedener Gene durch direkte Protein-Protein- bzw. Protein-DNA/RNA-Interaktion in Abhängigkeit ihrer enzymatischen

Aktivität regulieren (Commichau and Stülke, 2008). An diese Definition anknüpfend besteht die primäre Funktion von Trigger-PDEs darin, die Aktivität eines anderen Makromoleküls mittels direkter Interaktion zu kontrollieren. Durch Bindung und enzymatische Umsetzung von c-di-GMP kommt die sekundäre PDE-Funktion zum Tragen, welche die primäre Funktion reguliert. Die spezifische Rolle von PdeR beim c-di-GMP-abhängigen Umschalten von der Flagellen- auf die Matrixsynthese wird in Kapitel 1.1.4 näher erläutert.

1.1.3.3 Globale vs. lokale c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion

Eingehende Sequenzanalysen und experimentelle Daten haben gezeigt, dass unter den in *E. coli* kodierten 29 GGDEF-/EAL-Domänenproteinen 12 DGCs, 13 PDEs und 4 degenerierte Proteine vertreten sind (Tab. 1). Einige dieser Proteine werden verstärkt in der postexponentiellen oder stationären Wachstumsphase exprimiert, andere hingegen in sämtlichen Phasen oder überhaupt nicht. Während die Deletion der meisten dieser GGDEF-/EAL-Domänenproteine keinen Effekt bezüglich der Biofilmbildung zeigt, weisen einige Deletionsmutanten einen klaren Phänotypen auf (Hengge et al., 2016; Povolotsky and Hengge, 2016; Sarenko et al., 2017).

Die Multiplizität an c-di-GMP-umsetzenden Proteinen und Effektormolekülen innerhalb einer Spezies sowie beobachtete spezifische Phänotypen, die nur durch die Deletion bestimmter GGDEF-/EAL-Domänenproteine generiert werden, lassen lokale c-di-GMP-Kontrollmodule vermuten, die zeitlich und/oder räumlich versetzt agieren. Die Voraussetzung dafür können beispielsweise direkte **Protein-Protein-Interaktionen** sein, die die Formation spezifischer Systeme erlauben, welche aus bestimmten DGCs, PDEs, Effektor- sowie Zielmolekülen bestehen und eine vom zellulären c-di-GMP-Spiegel unabhängige Wirkung entfalten können. Tatsächlich wurden bereits solch hoch spezifische Systeme beschrieben (Dahlstrom et al., 2015; Lindenberg et al., 2013).

Eine umfassende Studie bezüglich des Interaktoms sämtlicher GGDEF-/EAL-Domänenproteine in *E. coli* (Sarenko et al., 2017) konnte kürzlich zeigen, dass die Aktivitäten all dieser GGDEF-/EAL-Domänenproteine weder aufsummiert werden, um die globalen zellulären c-di-GMP-Konzentrationen zu regulieren, noch als einzelne in sich geschlossenen Systeme zur Geltung kommen, in denen nebeneinander agierende DGC/PDE-Paare verschiedene Effektoren kontrollieren. Vielmehr wurde ein aus mehreren DGCs und PDEs bestehendes Supermodul beschrieben, das über diverse Protein-Protein-Interaktionen die Matrixsynthese reguliert. Hinzu kommen solche Vertreter, die keinerlei Interaktionen mit anderen GGDEF-/EAL-Domänenproteinen zeigen und deren Funktion z. T. nach wie vor ungeklärt ist (Sarenko et al., 2017).

Auch wenn die Deletion einiger DGCs (DgcE, DgcM, DgcC) bzw. PDEs, (PdeR, PdeH) drastische Auswirkungen auf die Biofilmbildung haben, wird der globale zelluläre c-di-GMP-

Spiegel von nur einer dieser Vertreter maßgeblich beeinflusst – PdeH. Diese unter flagellarer Genexpression (σ^{FliA}) stehende PDE stellt das am stärksten exprimierte GGDEF-/EAL-Domänenprotein in *E. coli* dar und hält den zellulären c-di-GMP-Spiegel während der exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase mit ca. 40 nM bzw. 80 nM auf einem geringen Niveau. Eine Deletion von *pdeH* hat stark erhöhte c-di-GMP-Konzentrationen zur Folge (ca. 1 μM), die v. a. durch eine zusätzliche Deletion von *dgcE* ($\Delta pdeH \Delta dgcE$) wieder um ca. 75 % abgesenkt werden können. DgcE trägt unter diesen Bedingungen demnach als Haupt-DGC zum Anstieg globaler zellulärer c-di-GMP-Mengen bei, aber auch weitere DGCs sind in geringerem Ausmaß beteiligt (Sarenko et al., 2017).

Die Autoren dieser Studie beschreiben somit ein neues Konzept der lokalen c-di-GMP-vermittelten Signaltransduktion (***fountain model***), wobei bei Anwesenheit der global wirkenden Master-PDE PdeH dem globalen Effekt der DGC-Aktivitäten entgegenwirkt wird. Lediglich wenn DGCs in unmittelbarer Nähe eines spezifischen Effektors lokal erhöhte c-di-GMP-Konzentrationen bewirken, wird eine spezifische zelluläre Antwort generiert. Zusätzlich zu einer lokal wirkenden DGC sind auch antagonistisch wirkende lokal agierende PDEs denkbar (Sarenko et al., 2017).

Das Modell (*fountain model*) geht mit der Tatsache konform, dass einige c-di-GMP-Effektoren K_d -Werte aufzeigen, die weit über der mittleren zellulären c-di-GMP-Konzentration in *E. coli* liegen und demnach eine relativ geringe Affinität zu ihrem Substrat aufweisen (Chou and Galperin, 2016; Pultz et al., 2012). Globale c-di-GMP-Konzentrationen sind dann nicht ausreichend für eine effektive Bindung, sodass solche Effektor-/Zielmolekül-Systeme auf lokal generierte c-di-GMP-Produktion angewiesen sind. Zu den zentralen GGDEF-/EAL-Domänenproteinen, die beim Umschalten von Flagellen- auf Matrixexpression eine tragende Rolle spielen, gehören PdeH, DgcE, DgcM, PdeR und DgcC. Deren Wirkungsweise beruht hauptsächlich auf lokaler Signaltransduktion und wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.1.4 Kontrollnetzwerk und Synthese von Matrixkomponenten in *E. coli*

Bei Wachstum unterhalb von 30°C und begünstigt durch geringe Salzkonzentrationen produziert *E. coli* in der Stationärphase Curli-Fimbrien und Phosphoethanolamin(pEtN)-Cellulose, wodurch die Biofilmbildung gefördert wird (Bokranz et al., 2005; Prigent-Combaret et al., 2001; Thongsomboon et al., 2018). Die Expression von solch extrazellulären Matrixsubstanzen und Flagellen erfolgt mittels invers regulierter Signalkaskaden, die auf alternierender Genexpression in unterschiedlichen Wachstumsphasen beruhen (Pesavento et al., 2008). Die flagellare Expressionskaskade läuft in postexponentiell wachsenden Zellen ab, wobei cAMP einen aktivierenden Einfluss ausübt. Das Molekül (p)ppGpp hingegen wirkt inhibierend auf die Flagellensynthese und begünstigt σ^S -abhängige Genexpression, die in *E. coli* u. a. zur Expression von Matrixsubstanzen führt (vgl. 1.1.2 & Abb. 2).

Der Synthese von extrazellulären Curli-Fimbrien und pEtN-Cellulose geht eine mehrstufige Transkriptionsfaktorkaskade ($\sigma^S \rightarrow \text{MlrA} \rightarrow \text{CsgD}$) voraus, die an das Vorhandensein von **c-di-GMP** gebunden ist und durch umweltabhängig exprimierte Transkriptionsregulatoren reguliert wird (Abb. 2).

In der postexponentiellen Wachstumsphase ist der globale Spiegel an c-di-GMP sehr gering (Sarenko et al., 2017), wodurch keine Matrixsynthese stattfinden kann. Zurückzuführen sind die geringen c-di-GMP-Konzentrationen v. a. auf die PDE-Aktivität von **PdeH** (früher YhjH), das unter der Kontrolle flagellarer Genexpression steht (Ko and Park, 2000). Beim Übergang in die Stationärphase kommt die flagellare Signalkaskade zum Erliegen, sodass auch PdeH-Proteinmengen abnehmen. Zeitgleich kommt σ^S -vermittelte Genexpression ins Spiel und leitet neben der Expression diverser GGDEF-/EAL-Domänenproteine – wie beispielsweise **DgcE**, **DgcM** und **PdeR** (früher YegE, YdaM und YciR) – die des MerR-ähnlichen Transkriptionsfaktors **MlrA** ein. Es kommt zu einer zunehmenden DGC-Aktivität – vornehmlich durch DgcE, aber in geringerem Ausmaß auch durch weitere σ^S -abhängige DGCs. Dabei steigt der globale c-di-GMP-Spiegel aber nur leicht an (Sarenko et al., 2017; Sommerfeldt et al., 2009) (vgl. 1.1.3.3). Zusammen mit der enzymatisch aktiven DGC DgcM als Co-Aktivator bindet MlrA in der Promotorregion von *csgD* und bewirkt unter Beteiligung von $\text{E}\sigma^S$ die Expression des LuxR-ähnlichen Transkriptionsfaktors CsgD, welcher als Masterregulator der Biofilmbildung gilt (Ogasawara et al., 2010; Römling et al., 2000; Weber et al., 2006). Zudem bindet das Effektorprotein YcgR c-di-GMP und agiert durch direkte Interaktion mit Komponenten des flagellaren Basalkörpers als Bremse der Flagellenrotation, wodurch die zelluläre Motilität auch post-translational inhibiert wird (Boehm et al., 2010; Paul et al., 2010; Ryjenkov et al., 2006).

Die MlrA/DgcM-vermittelte CsgD-Expression unterliegt jedoch einer komplexen Regulation, wobei die PdeH/DgcE-kontrollierte c-di-GMP-Synthese und die Trigger-PDE (vgl. 1.1.3.2) PdeR eine zentrale Rolle spielen. Primär inhibiert PdeR über direkte Protein-Protein-Interaktion MlrA und DgcM, sodass diese nicht als *csgD*-Transkriptionsaktivatoren fungieren können. Erst wenn ab dem Übergang in die Stationärphase die Expression von PdeH abnimmt und die Aktivität von DgcE zunimmt, kommt die sekundäre enzymatische Funktion von PdeR zum Tragen. PdeR beginnt damit, das von DgcE produzierte c-di-GMP zu binden und abzubauen, was mit der Entlassung von MlrA und DgcM einhergeht. Einerseits trägt die daraufhin zunehmende DGC-Aktivität von DgcM zu zusätzlicher c-di-GMP-Produktion bei (positive Rückkopplung) und andererseits leitet MlrA mit DgcM als Co-Aktivator die Transkription des *csgDEFG*-Operons und somit die Expression von CsgD ein (Abb. 2).

Die Aktivitätskontrolle von MlrA durch DgcM und PdeR innerhalb dieses ersten Kontrollmoduls ist folglich ein Beispiel lokaler c-di-GMP-abhängiger Signaltransduktion, die auf direkten Protein-Protein-Interaktionen beruht (Hengge, 2016; Lindenberg et al., 2013).

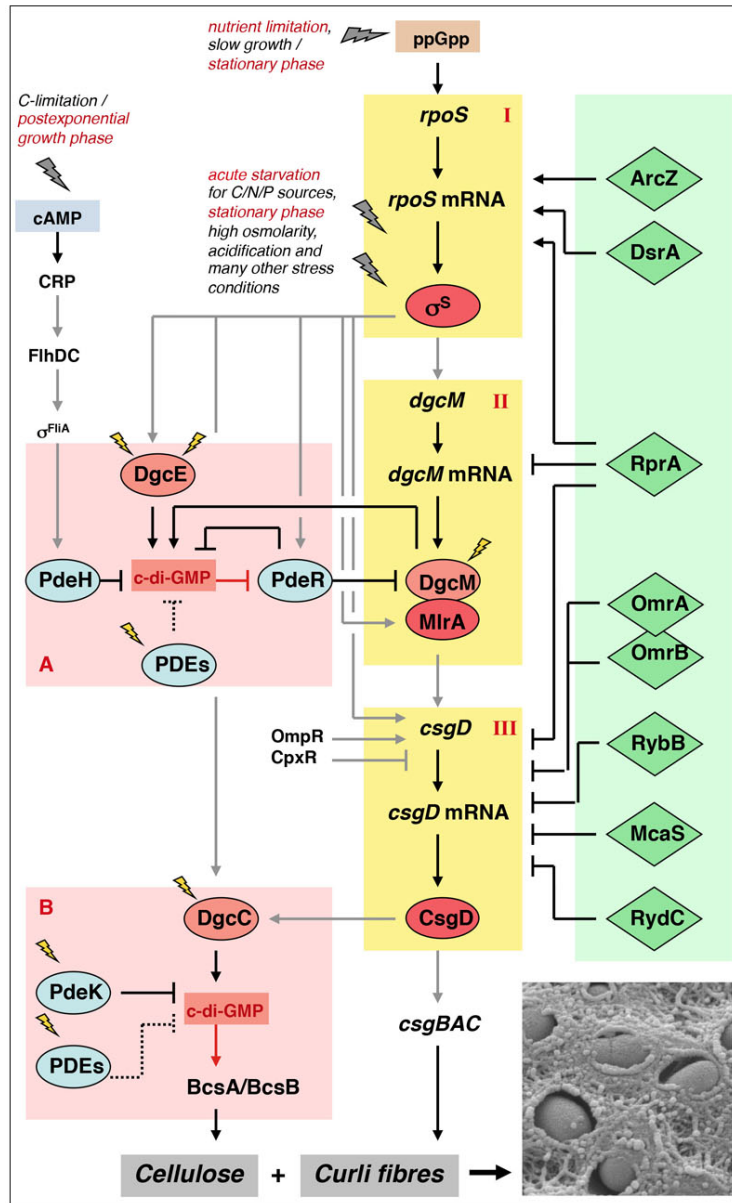


Abb. 2: Kontrollnetzwerk extrazellulärer Matrixkomponenten in *E. coli*. Der Synthese von Curli-Fimbrien und pEtN-Cellulose geht eine 3-stufige Transkriptionsfaktorkaskade voraus (gelb unterlegt: I σ^S , II σ^S , III σ^S), die durch zwei c-di-GMP-Kontrollmodule (rot unterlegt: A und B) sowie diverse umweltabhängig exprimierte sRNAs (grün unterlegt) und Transkriptionsregulatoren (z. B. CpxR und OmpR) reguliert wird. Das erste c-di-GMP-abhängige Modul kontrolliert den Übergang von postexponentieller Flagellensynthese hin zur Expression von extrazellulären Matrixkomponenten in der stationären Wachstumsphase. Es umfasst die σ^{FliA} -abhängig exprimierte PDE PdeH sowie die σ^S -kontrollierten DGCs DgcE und DgcM und das Trigger-Enzym PdeR. Gemeinsam regulieren diese Komponenten die Expression des Biofilmmasterregulators CsgD durch σ^S und DgcM als Co-Aktivator. In der postexponentiellen Phase wird die c-di-GMP-Konzentration durch die global wirkende PdeH niedrig gehalten. Die primäre Funktion von PdeR besteht darin, σ^S und DgcM durch direkte Protein-Interaktionen zu inhibieren. Beim Übergang in die Stationärphase nehmen die PdeH-Proteinmengen ab und die DGC-Aktivität von DgcE nimmt zu. PdeR übt daraufhin seine sekundäre Funktion als PDE aus (Abbau von v. a. DgcE-produziertem c-di-GMP) und entlässt σ^S und DgcM. Daraufhin wird einerseits DgcM enzymatisch aktiv und trägt zusätzlich zur c-di-GMP-Produktion bei, andererseits kommt es zur Expression von CsgD durch σ^S und DgcM, wodurch die Expression von Curli-Fimbrien direkt aktiviert wird. Das zweite c-di-GMP-Kontrollmodul ist der CsgD-Expression nachgeschaltet und wirkt sich spezifisch auf die Synthese von pEtN-Cellulose aus. Die DGC DgcC, welche CsgD-abhängig exprimiert wird, und die PDE PdeK regulieren lokal die c-di-GMP-Konzentration in unmittelbarer Nähe der Cellulosesynthase-Untereinheit BcsA, die durch Bindung von c-di-GMP aktiviert wird. Diverse sRNAs greifen zusätzlich an unterschiedlichen Positionen positiv bzw. negativ in die Matrixsynthese ein. Diese Abb. wurde modifiziert nach [(Mika and Hengge, 2014): veröffentlicht in RNA Biol. mit Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported License].

CsgD wirkt als direkter Expressionsaktivator des *csgBAC*-Operons, das für die Struktureinheiten der amyloiden **Curli-Fimbrien** kodiert (Hammar et al., 1995; Römling et al., 1998) (Abb. 2). Die weiteren Genprodukte der zwei divergent arrangierten Curli-Operone (CsgE/F/G/B/A/C) weisen alle eine Sec-abhängige Signalsequenz auf, mithilfe derer die Proteine ins Periplasma sekretiert werden. CsgG oligomerisiert daraufhin an der äußeren Membran und bildet eine porenähnliche Struktur aus, durch welche CsgB und CsgA mithilfe von CsgC/E/F an die Zelloberfläche transportiert werden (Barnhart and Chapman, 2006; Chapman et al., 2002; Robinson et al., 2006). CsgB assoziiert dort mit CsgF und bewirkt als Nukleatorprotein die Polymerisierung von CsgA-Untereinheiten zu einer geordneten amyloiden Curli-Fimbrie (Hammar et al., 2007; Nenninger et al., 2009).

Neben der direkten Aktivierung der Curli-Expression bewirkt CsgD außerdem indirekt die **Synthese und Modifizierung von Cellulose**, was von einem zweiten c-di-GMP-Kontrollmodul reguliert wird (Abb. 2). CsgD aktiviert zusammen mit Eo^S die Transkription des DGC-Gens *dgcC* (Römling et al., 2000; Sommerfeldt et al., 2009). **DgcC** (früher YaiC) ist mit einer MASE2-Domäne, die sechs Transmembrandomänen (TMs) umfasst, in der inneren Zellmembran verankert (Nikolskaya et al., 2003) und vermutlich direkt mit dem Cellulosesynthase-Komplex assoziiert (Richter, 2016). In *E. coli* übernimmt DgcC eine ganz spezifische Rolle in der Synthese von pEtN-Cellulose, indem es als lokale c-di-GMP-Quelle die katalytische Cellulosesynthase-Untereinheit **BcsA** aktiviert. Selbiges ist der Fall für das DgcC-Homolog AdrA in *Salmonella*. Deletionen von *dgcC* bzw. *adrA* führen zum Verlust der Cellulosesynthese, haben hingegen keinerlei Auswirkung auf die Curlisynthese (Römling et al., 2000; Sarenko et al., 2017; Weber et al., 2006; Zogaj et al., 2001). Die PDE PdeK wirkt ebenfalls spezifisch auf die Cellulosesynthese, wobei der genaue Wirkmechanismus noch weiterer Analysen bedarf (A. Richter & R. Hengge, unveröffentlicht).

Die für Celluloseexpression kodierenden Gene sind in einer Vielzahl von Beta- und Gammaproteobakterien ähnlich, jedoch sind Abweichungen in der Anordnung sowie Anzahl an Genen zu verzeichnen. In *E. coli* sind entsprechende Genloci in den divergent arrangierten Operonen *bcsRQABZC* und *bcsEFG* organisiert, wobei ersteres vorwiegend für Komponenten des Cellulosesynthase-Komplexes kodiert und das zweite für die zur Modifikation zu pEtN-Cellulose (Römling and Galperin, 2015; Thongsomboon et al., 2018).

Die Synthese wird im Cytoplasma an der inneren Membran initiiert (Bureau and Brown, 1987). Dabei stellen die membranständigen Untereinheiten BcsA und BcsB *in vitro* das minimal notwendige Modul dar (Omadjela et al., 2013) und sind in sämtlichen bisher beschriebenen Cellulosesynthase-Komplexen zu finden. Der BcsAB-Komplex formt einen Kanal, durch den das Polymer co-synthetisch durch die Membran geschleust wird (Morgan et al., 2013). BcsA weist eine cytoplasmatische Glykosyltransferase (GT) sowie eine C-terminale c-di-GMP-bindende PilZ-Domäne auf und katalysiert die Polymerisierung von

UDP-Glukose zu β -1,4-glykosidisch verknüpften Glucanketten mithilfe seiner GT (Lin et al., 1990). Das katalytische Zentrum wird jedoch durch einen *gating loop* blockiert und erst zugänglich, sobald c-di-GMP an die PilZ-Domäne von BcsA bindet und so eine Konformationsänderung bewirkt (Morgan et al., 2014). Mit einer K_d von 8 μ M (Pultz et al., 2012) ist BcsA auf sehr hohe c-di-GMP-Konzentrationen angewiesen, die die zellulären Konzentrationen weit übersteigen. Diese Tatsache untermauert zusätzlich die lokal vermittelte Aktivierung der Cellulosesynthese durch DgcC. Für Cellulosesynthese *in vivo* ist zudem BcsC notwendig, welches vermutlich für den Transport des Polymers aus der Zelle heraus vonnöten ist, indem es neben Interaktionen mit weiteren Bcs-Untereinheiten eine Pore in der äußeren Zellmembran bildet (Wong et al., 1990). Die Rolle der Untereinheiten BcsZ/Q/R ist ebenfalls noch nicht abschließend geklärt. Experimentelle Daten weisen allerdings darauf hin, dass die endo- β -1,4-Glucanase BcsZ akkumulierte Glucanketten im Periplasma abbaut (Mazur and Zimmer, 2011) und BcsR für die Sekretion vonnöten ist (Krasteva et al., 2017). Die Sekretion von pEtN-Cellulose erfolgt an den Zellpolen, wobei BcsQ an der Lokalisation des Cellulosesynthase-Komplexes an den Zellpol beteiligt ist (Le Quere and Ghigo, 2009).

Die kürzlich publizierte Arbeit von Thongsomboon *et al.* (2018) konnte erstmals zeigen, dass Cellulose in *E. coli* mithilfe des BcsEFG-Systems chemisch modifiziert wird, was zur Biofilmarchitektur beiträgt. Die Autoren schlagen vor, dass das Transmembranprotein BcsG hierbei als pEtN-Transferase dient, die das Polymer im Periplasma zu pEtN-Cellulose modifiziert. Mit diesem Komplex assoziiert ist das c-di-GMP-bindende Protein BcsE, sodass der Modifizierungsprozess vermutlich ebenfalls durch c-di-GMP kontrolliert wird (Fang et al., 2014; Thongsomboon et al., 2018).

Im Vergleich zu vielen kommensalen und pathogenen *E. coli*-Stämmen sind domestizierte K12-Laborstämme nicht in der Lage, pEtN-Cellulose zu produzieren und exprimieren lediglich amyloide Curli-Fimbrien als Matrixsubstanz (Da Re and Ghigo, 2006). Dies resultiert aus einer Punktmutation innerhalb des *bcsQ*-Gens, wodurch ein Stop-Codon zu Beginn des *bcsQ*-Gens im *bcsRQABZC*-Operon die Expression der Cellulosesynthase-Maschinerie verhindert. Durch die Einführung eines Sinn-Codons im *E. coli* K12-Stamm W3110 konnten Serra *et al.* die Cellulosesynthese wiederherstellen (Serra et al., 2013a). Dieser als **AR3110** bezeichnete Stamm produziert sowohl Curli-Fimbrien als auch pEtN-Cellulose und diente im Rahmen dieser Arbeit als Modellorganismus der Biofilmbildung (vgl. auch Abb. 4).

Innerhalb der Matrix-kontrollierenden Transkriptionsfaktorkaskade spielen also zwei c-di-GMP-Kontrollmodule eine entscheidende regulative Rolle: (i) PdeH, DgcE, DgcM und PdeR regulieren die MlrA-vermittelte Transkription von *csgD*, wodurch die Expression von Biofilmmatrix eingeleitet wird, und (ii) DgcC aktiviert spezifisch die pEtN-Cellulosesynthese ohne Einfluss auf die Curli-Expression. Die lokale Aktivität von DgcC, sowie die räumliche

Assoziation der für Cellulosesynthese und –modifikation notwendigen Proteinkomplexe (A. Richter & R. Hengge, unveröffentlicht) lässt vermuten, dass DgcC-produziertes c-di-GMP auch an Modifizierungsprozessen beteiligt ist (durch Bindung an BcsE).

Die oben beschriebene Kontrollkaskade wird an diversen Positionen von umweltabhängig aktiven kleinen RNAs (sRNAs) reguliert (Mika and Hengge, 2014) (Abb. 2).

Ein wichtiger Regulator ist **RprA**, wodurch alle drei Ebenen der Transkriptionsfaktorkaskade beeinflusst werden. Bei Zellhüllstress wird RprA-Expression durch das Phosphorelay-System RcsC/D/B aktiviert. Durch Bindung von RprA an die 5'UTR-Region der *rpoS*-mRNA wird diese stabilisiert und erhöhte *rpoS*-Translation bewirkt (Majdalani et al., 2001; Majdalani et al., 2002; McCullen et al., 2010). Dieser positiven σ^S -Kontrolle steht die negative Regulation von *dgcM* und *csgD* gegenüber. RprA bindet die mRNA beider Gene, inhibiert deren Proteinexpression und wirkt somit der Biofilmmatrixsynthese entgegen (Mika et al., 2012). Zurückgeführt wird die gegensätzliche Regulation auf die Notwendigkeit der σ^S -vermittelten generellen Stressantwort bei Zellhüllstress, wohingegen die Synthese von Matrixkomponenten dabei hinderlich sein könnte (Mika and Hengge, 2014).

Eine weitere durch Zellhüllstress aktivierte sRNA stellt **RybB** dar, die unter σ^E -Kontrolle steht und bei Zellhüllstress die Expression der *csgD*-mRNA durch direkte Bindung negativ beeinflusst (Papenfort et al., 2006; Serra et al., 2016).

Die Transkription von *csgD* unterliegt zudem der Regulation durch die Transkriptionsregulatoren **CpxR** und **OmpR**. Dabei beeinflusst CpxR die *csgD*-Expression negativ, wohingegen OpmR einen positiven Einfluss auf diese ausübt (Gerstel et al., 2003; Prigent-Combaret et al., 2001).

1.2 Physiologische Differenzierung bedingt die Biofilmmarchitektur

In den letzten Jahren rückte vermehrt die physiologische Differenzierung innerhalb von Biofilmen in den Vordergrund. Obwohl bereits vor mehr als 30 Jahren morphologisch unterscheidbare Zelltypen innerhalb einer *E. coli* Kolonie gezeigt wurden (Shapiro, 1987), konnten diese Unterschiede erst Jahre später mit physiologischer Heterogenität innerhalb eines Biofilms erklärt und mittels hochauflösender Elektronenmikroskopie veranschaulicht werden (Hung et al., 2013; Serra et al., 2013b; Stewart and Franklin, 2008). Es stellte sich heraus, dass die in Flüssigkultur temporal nacheinander auftretenden physiologischen Unterschiede (vgl. 1.1.2) direkt auf Makrokolonie-Biofilme übertragbar sind. Diese Unterschiede treten jedoch weniger in zeitlicher Abfolge nacheinander auf, sondern zudem und vor allem räumlich nebeneinander, sodass sowohl extrazelluläre Matrixkomponenten als auch Flagellen zu den strukturellen Bestandteilen gehören. Somit sind klar voneinander

abgrenzbare Zonen innerhalb eines Biofilms auszumachen, deren physiologische Zustände letztlich die makroskopische Biofilmarchitektur bestimmen (Klauck et al., 2018; Serra and Hengge, 2014; Serra et al., 2015). Je nach Spezies und der herrschenden Umweltbedingungen resultiert die Bildung von Makrokolonien in charakteristischen 3-dimensionalen Gebilden, die als hervorragende Studienobjekte dienen.

1.2.1 Mikroskopischer Aufbau eines *E. coli* Biofilms

Maßgeblich für die räumliche Differenzierung innerhalb eines Biofilms sind Sauerstoff- und Nährstoffgradienten, die unvermeidlich entstehen (Rani et al., 2007; Serra and Hengge, 2014). Solche Gradienten bedingen die Expression von Genregulons, die für entsprechende Wachstumsphasen typisch sind. Eine Makrokolonie von *E. coli* weist am nährstoffreichen Boden und den äußeren Kolonierändern stäbchenförmige flagellierte Zellen auf, die dem späten postexponentiellen Stadium einer Flüssigkultur entsprechen. Solche Zellen sind von einem dichten Geflecht an ineinander verknöteten Flagellen umgeben. In den oberen Schichten hingegen finden sich kleine Stationär-Zellen, die von einer selbstproduzierten Matrix umhüllt sind. Dabei bilden Curli-Fimbrien ein starres korbartiges Geflecht um die Zellen herum, wohingegen sich pEtN-Cellulosefasern zwischen den Zellen als tiefreichende flächige Strukturen zusammenlagern und als ein flexibles Verbundmaterial für Elastizität sorgen. Zwischen den zwei strukturell unterschiedlichen Schichten befindet sich eine heterogene Zone, in der flagellierte Zellen direkt neben bereits biofilmmatrixproduzierenden Zellen co-existieren (Serra et al., 2013a).

Kürzlich konnten Klauck *et al.* (2018) anhand von *gfp*-Reporter-genfusionen eindrücklich zeigen, wie diese Biofilmarchitektur entlang von **Nähr- und Sauerstoffgradienten** durch unterschiedliche globale Genexpression und c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion in verschiedenen Schichten zustande kommt (Abb. 3). In der unteren Schicht erfolgt ein klassischer nährstoffabhängiger Übergang von σ^{70} - hin zu σ^{FliA} - und σ^S -kontrollierter Genexpression. Aufgrund der mikro-aeroben Bedingungen in diesem Bereich ist jedoch auch bei guter Nährstoffversorgung nur langsames Wachstum möglich (kaum ribosomale Expression). Außerdem findet in dieser Zone noch keine Matrixproduktion statt, was vermutlich an geringen c-di-GMP-Mengen aufgrund starker *pdeH*-Expression (σ^{FliA} -abhängig) liegt. Die mittlere Zone ist von starker Heterogenität geprägt. Hohe ribosomale Expression lässt auf schnelleres Wachstum schließen, was auf zunehmende aerobe Verhältnisse zurückführbar ist. Da *pdeH* nur noch in vereinzelten Subpopulationen exprimiert wird, die *csgD*-Expression hingegen von einigen Zellen bereits initiiert wurde, sind hier matrixproduzierende Zellen neben nicht-matrixproduzierenden Zellen zu finden. In den obersten Schichten wird die Nährstoffversorgung schließlich zum limitierenden Faktor, sodass σ^S -kontrollierte Genexpression stark zunimmt und somit auch CsgD akkumuliert.

Somit ist die oberste Schicht durch eine dichte extrazelluläre Matrix gekennzeichnet (Klauck et al., 2018).

In einer Makrokolonie herrschen folglich auf begrenztem Raum unterschiedliche Umweltbedingungen, wodurch aufgrund differentieller Genexpression eine **heterogene Lebensgemeinschaft** aus diversen Subpopulationen entsteht. Die daraus resultierenden makroskopischen Ausbildungen werden im folgenden Abschnitt erläutert.

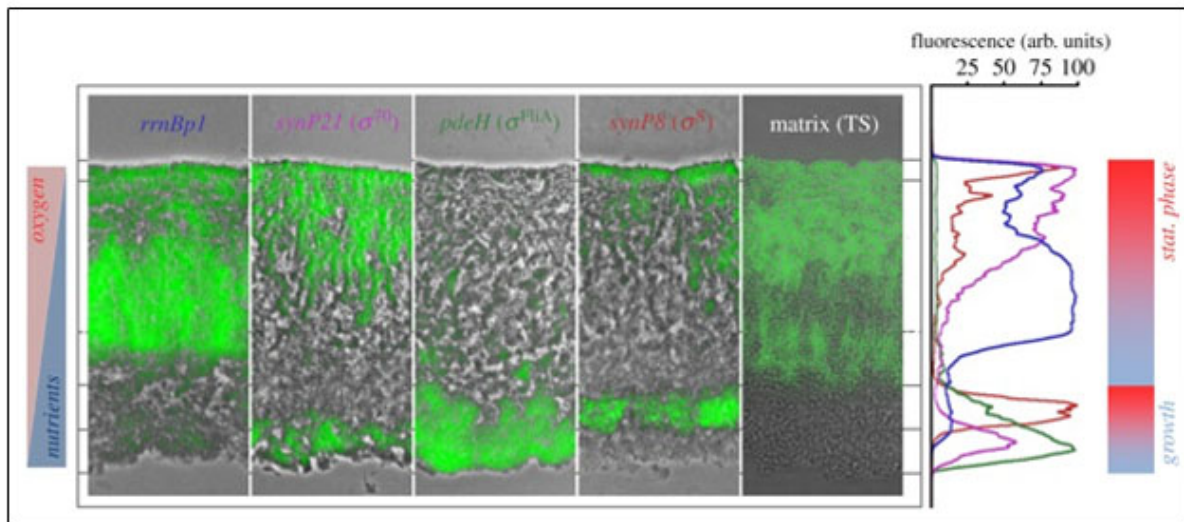


Abb. 3: Physiologische Differenzierung erzeugt eine 3-schichtige Biofilmarchitektur. Gezeigt ist ein Querschnitt einer Makrokolonie des *E. coli* K12 Stammes AR3110, der sowohl Curli-Fimbrien als auch pEtN-Cellulose als extrazelluläre Matrixbestandteile exprimiert. Sowohl Nährstoff- als auch Sauerstoffgradienten tragen zu definierten Zonen globaler Genexpression innerhalb einer AR3110-Makrokolonie (2 d bei 28°C auf LBnoS) bei, wodurch physiologisch unterscheidbare Zellpopulationen entstehen mit matrixproduzierenden Zellen in ausschließlich oberen Zonen (siehe TS), flagellierten Zellen in unteren Schichten sowie an den Kolonierändern und einer heterogenen mittleren Schicht, in der flagellierte und matrixproduzierende Zellpopulationen direkt nebeneinander co-existieren (Klauck et al., 2018; Serra and Hengge, 2014). Näheres ist dem Haupttext zu entnehmen. Die in dieser Abb. gezeigte Expression von *gfp*-Reporterfusionen [Blau = *rrnBp1* (ribosomale Genexpression), Rosa = σ^{70} , grün = σ^{FliA} , Rot = σ^S] wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert. TS steht für Thioflavin S, welches Curli und pEtN-Cellulose bindet. Diese Abb. wurde modifiziert nach [(Klauck et al., 2018): veröffentlicht in Open Biol. mit Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0)].

1.2.2 Makroskopische Ausprägungen von *E. coli* Biofilmen

Entscheidend für die Beschaffenheit eines Biofilms ist v. a. die Zusammensetzung und Architektur der extrazellulären Matrix, die bei *E. coli* von stationären Zellen produziert wird (vgl. 1.1.4) und Schutz für die gesamte Biofilmgemeinschaft bietet. Je nachdem aus welchen Bestandteilen die Matrix zusammengesetzt ist und in welchem Verhältnis diese vorhanden sind, entstehen aufgrund spezifischer physikalischer Eigenschaften charakteristische komplex strukturierte 3-dimensionale Morphologien. Verfolgt man die Reifung von Makrokolonien auf Kongorot-haltigen LB-Platten ohne Salz (LBnoS) für 5 Tage bei 28 °C, so lassen sich flächige Gebilde beobachten, die diverse Strukturen wie Fältchen, hohe Stege

und konzentrische Ringe ausbilden. Solche als *rdar* (*red, dry and rough*) bezeichneten Kolonien entstehen als Folge von wachstumsbedingter Zellzunahme sowie der kohäsiven und elastizitätsverleihenden Eigenschaften der Matrix. Aufgrund von Kongorotbindung durch Curli-Fimbrien und pEtN-Cellulose nehmen die Makrokolonien zudem eine dunkelrote Färbung an (Römling, 2005; Serra et al., 2013a). Da in dieser Arbeit eine vergleichende Analyse von *E. coli* Makrokoloniemorphologien durchgeführt wurde, werden die phänotypischen **Auswirkungen der einzelnen Matrixkomponenten** im Folgenden erläutert (Abb. 4).

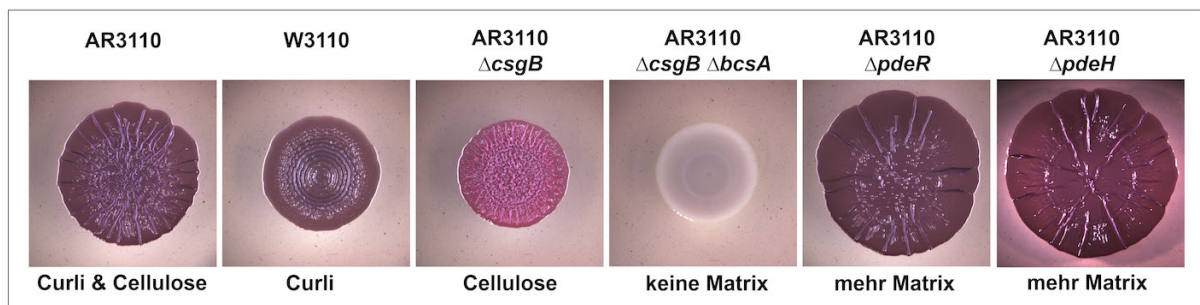


Abb. 4: Phänotypische Ausprägung von *E. coli* Makrokolonien in Abhängigkeit exprimierter Matrixkomponenten. Makrokolonien von *E. coli* K12-Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. Details bezüglich der einzelnen Phänotypen sind dem Haupttext zu entnehmen und veröffentlicht in (Sarenko et al., 2017; Serra et al., 2013a).

Eine *E. coli* Makrokolonie, die sowohl Curli-Fimbrien als auch pEtN-Cellulose produziert (AR3110), nimmt eine große Fläche ein und ist bei Anwesenheit von Kongorot im Medium tiefrot gefärbt. Sie ist flach mit radial verlaufenden hohen Stegen und kleineren Fältchen. Das Zusammenspiel beider Komponenten verleiht der Kolonie Stabilität und Elastizität zugleich, sodass ein gewebeähnlicher Verbund entsteht. Zunehmendes Wachstum erzeugt Spannungen, die in der Auffaltung hochreichender Stege resultieren. Fehlt pEtN-Cellulose als Komponente (W3110), ist die entsprechende Makrokolonie kleiner, dicker und weist ein typisches Muster aus konzentrischen Ringen auf. Durch fehlende Elastizität können keine hohen Stege ausgebildet werden, sondern es entstehen beim Wachstum Risse innerhalb der brüchigen Curli-Matrix in den oberen Schichten und Aufwölbungen durch Wachstum in den unteren Schichten. Wird ausschließlich pEtN-Cellulose exprimiert (AR3110 Δ csgB), nimmt die Kolonie eher pinkfarbene Rottöne an und bildet eine Vielzahl an kleinen Aufwölbungen aus. Das fehlende Curli-Geflecht führt dazu, dass die Zellen beim Koloniewachstum beweglicher sind und keine derart hohen Stege entstehen können wie im AR3110-Stamm. Makrokolonien, die keine der beiden Matrixkomponenten ausbilden (AR3110 Δ csgB Δ bcsA), erscheinen weiß mit glatter Oberfläche. Wird die Produktion beider Komponenten erhöht, entstehen dunkelrot gefärbte Kolonien, die größer und noch flacher als die des Wildtyps sind. Radial verlaufende Stege sind höher, aber in geringerer Anzahl vorhanden. Ein solcher

Phänotyp entsteht z. B. durch verstärkte *csgD*-Expression in Folge einer erhöhten zellulären c-di-GMP-Konzentration in einer *pdeH*-Deletionsmutante. Aber auch die Deletion von *pdeR* bewirkt erhöhte *csgD*-Expression aufgrund der fehlenden Inhibition der Transkriptionsaktivatoren MlrA und DgcM (vgl. 1.1.4).

Neben Matrixkomponenten gehören auch **Flagellen** zu den strukturellen Elementen eines Biofilms. Anhand verschiedener Spezies wie beispielsweise *E. coli*, *P. aeruginosa* und *V. cholerae* konnte gezeigt werden, dass diese Organellen und die daraus resultierende Motilität für die Oberflächenadhäsion und somit für die Initiation von Biofilmbildung ein wichtiges Element darstellen (O'Toole and Kolter, 1998; Pratt and Kolter, 1998; Watnick et al., 2001; Wood et al., 2006). Serra *et al.* (2013b) konnten zeigen, dass Makrokolonien von Mutanten des *E. coli*-Stammes W3110, die keine Flagellen ausbilden ($\Delta fliC$) oder diese nicht rotieren können ($\Delta motA$), kein typisches Ringmuster ausbilden. Zurückgeführt wird dieser Befund auf fehlende bzw. verminderte Flagellenverknötungen an den Rändern sowie in den unteren Schichten der Kolonien.

Ein dichtes Netzwerk an verknöteten Flagellen dient demnach als stabilisierende Plattform, die für wildtypische Biofilmstrukturierung vonnöten ist. Interessanterweise kann die reduzierte Koloniemorphologie von $\Delta fliC$ - und $\Delta motA$ -Mutanten durch erhöhte c-di-GMP-Spiegel teilweise kompensiert werden. So ist eine $\Delta flhDC$ -Mutante, die weder *fliC* und *motA* noch *pdeH* exprimiert (und folglich mehr c-di-GMP und Curli-Fimbrien produziert), sehr wohl in der Lage, ein Ringmuster zu erzeugen (Serra et al., 2013b).

1.3 DgcE als Master-DGC der Matrixproduktion

Die Diguanylatzyklase (DGC) DgcE weist eine äußerst komplexe Domänenarchitektur auf und agiert als Schlüsselkomponente während der Umstellung von flagellarer Genexpression auf die Expression extrazellulärer Matrixkomponenten (vgl. Abb. 2 & 5). In diesem Kapitel wird der Wissensstand bezüglich DgcE zu Beginn dieser Promotionsarbeit zusammengefasst, auf dem diese Arbeit basiert.

1.3.1 DgcE – ein Multidomänenprotein

Mit einer Größe von 1105 Aminosäuren (AS) und sechs Domänen ist DgcE nicht nur der bei weitem größte, sondern auch strukturell komplexeste Vertreter der 12 DGCs in *E. coli* K12. DgcE ist durch insgesamt zehn N-terminale Transmembrandomänen (TMs) in der inneren Zellmembran verankert. Die ersten acht TMs bilden eine als MASE1(membrane associated sensor 1) annotierte Domäne, an die sich zwei weitere TMs anschließen. Der cytoplasmatische Proteinanteil umfasst drei PAS/PAC-Domänen, eine GGDEF-Domäne

sowie eine EAL-Domäne (Hengge et al., 2016; Nikolskaya et al., 2003; Povolotsky and Hengge, 2016) (Abb. 5).

Die GGDEF-Domäne von DgcE beinhaltet neben einem katalytisch aktiven Zentrum (A-site) auch eine inhibitorische c-di-GMP-Bindestelle (I-site) und vermittelt die DGC-Aktivität. Sequenzanalysen ergaben, dass die C-terminale EAL-Domäne weder die notwendigen Aminosäuremotive für die Bindung noch für den katalytischen Abbau von c-di-GMP aufweist. Demnach gilt sie als eine enzymatisch inaktive und degenerierte Domäne (Povolotsky and Hengge, 2016; Sommerfeldt et al., 2009), deren Funktion zu Beginn dieser Promotionsarbeit unbekannt war. Auch die Bedeutung der sensorischen MASE1- und PAS-Domänen für die Aktivität von DgcE war unklar. Nähere Erläuterungen bezüglich der einzelnen Domänenfamilien sind den Kapiteln 1.1.3.1 und 1.1.3.2 zu entnehmen.

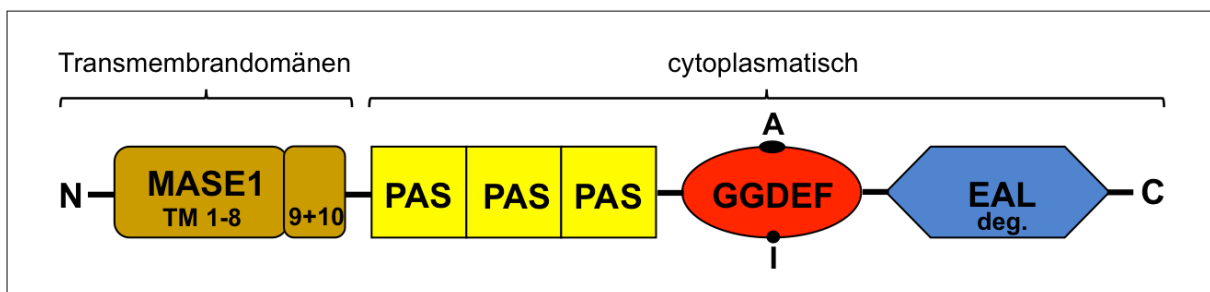


Abb. 5: Schematische Darstellung der Diguanylatzyklase DgcE. Die Diguanylatzyklase DgcE ist mit einer Größe von 1105 Aminosäuren das größte und komplexeste GGDEF-/EAL-Domänenprotein in *E. coli* K12. Über zehn N-terminale Transmembrandomänen (TMs) wird DgcE in der inneren Zellmembran verankert, wobei TM 1-8 eine sensorische als MASE1 annotierte Domäne bilden, an die sich zwei weitere TMs anschließen (TM 9+10). Der cytoplasmatische Proteinanteil besteht aus drei sensorischen PAS/PAC-Domänen, einer enzymatisch aktiven GGDEF-Domäne mit aktivem (A) und inhibitorischem (I) Zentrum sowie einer C-terminalen EAL-Domäne. Aufgrund fehlender Aminosäuremotive, die für c-di-GMP-Bindung und -Katalyse vonnöten sind, gilt die EAL-Domäne als degeneriert (deg.).

1.3.2 DgcE als Schlüsselkomponente der Matrixsynthese

Der komplexe Aufbau von DgcE steht in Einklang mit der entscheidenden Rolle, die DgcE während der Umstellung von Flagellensynthese und -aktivität hin zur Matrixsynthese innehat. In wachsenden Zellen einer LB-Flüssigkultur findet eine Basalexpression von *dgcE* statt. Ab dem Eintritt in die stationäre Phase nimmt die *dgcE*-Expression in Abhängigkeit von σ^S -vermittelter Genexpression stark zu, wohingegen die Proteinmengen der PDE PdeH aufgrund verminderter flagellarer Genexpression abnehmen. DgcE trägt daraufhin als Hauptantagonist von PdeH zu einer vermehrten c-di-GMP-Synthese bei, allerdings sind in geringerem Ausmaß auch weitere DGCs (z. B. DgcQ) beteiligt. Einerseits bewirkt die zunehmende DGC-Aktivität die weitere Inhibition der Motilität, indem das c-di-GMP-bindende Effektorprotein YcgR aktiviert wird und die Flagellenrotation unterbindet. Andererseits stellt DgcE das c-di-GMP bereit, welches der interaktionsvermittelten inhibierenden Wirkung von

PdeR auf DgcM und MlrA entgegenwirkt. PdeR beginnt damit, c-di-GMP abzubauen, wodurch MlrA und DgcM frei werden und die Transkription von *csgD* aktivieren (Lindenberg et al., 2013; Pesavento et al., 2008; Sarenko et al., 2017; Sommerfeldt et al., 2009) (vgl. 1.1.4).

DgcE agiert beim Eintritt in die Stationärphase also als Schlüsselkomponente, welche die CsgD-vermittelte Expression extrazellulärer Matrixkomponenten einleitet, indem es das auf lokaler Signaltransduktion beruhende PdeR/DgcM/MlrA-Modul reguliert.

Mutanten, die kein DgcE exprimieren, weisen deutlich verringerte CsgD-Proteinmengen und *csgB::lacZ*-Expression auf (Pesavento et al., 2008; Sommerfeldt et al., 2009). Die somit verringerte Expression an Matrixkomponenten resultiert schließlich in einem stark reduzierten Makrokolonie-Phänotypen (Sarenko et al., 2017; Serra et al., 2013b).

Dass DgcE die *csgD*-Expression über den PdeR/DgcM/MlrA-Komplex aktiviert, wurde erstmals von Lindenberg et al. (2013) gezeigt. In einer *pdeR*-Deletionsmutante wurde eine deutlich stärkere *csgB::lacZ*-Expression gemessen als im Wildtypen, was auf den fehlenden inhibitorischen Effekt von PdeR auf DgcM/MlrA zurückzuführen ist. Diese erhöhte *csgB::lacZ*-Expression blieb auch bei einer zusätzlichen Deletion von *dgcE* ($\Delta pdeR \Delta dgcE$) unverändert. In dieser Doppelmutante ist demnach lediglich die Deletion von *pdeR* ausschlaggebend, wohingegen fehlende DgcE-Aktivität keinen kompensierenden Effekt ausübt.

Der aktivierende Effekt von DgcE ist folglich der Wirkung des PdeR/DgcM/MlrA-Komplexes vorangeschaltet (Lindenberg et al., 2013). Wie jedoch DgcE selbst aktiviert wird, d. h. welche Signale DgcE wahrnimmt und wie diese in das komplexe Kontrollnetzwerk der Matrixsynthese integriert werden, blieb nach wie vor unklar.

Die Bedeutung von DgcE für die Synthese von Matrixkomponenten wird zudem in einer Studie bezüglich pathogener *E. coli* Stämme deutlich. Für mehrere EHEC-, EPEC- und EAEC-Stämme wurden u. a. Mutationen innerhalb von *dgcE* beschrieben, die zur Expression stark verkürzter Proteine führen. In solchen Stämmen könnte sich eine starke Matrixsynthese nachteilig auf ihre Virulenz auswirken, weshalb sie durch die Inaktivierung von DgcE vermindert wird (Povolotsky and Hengge, 2016).

Bereits vor mehr als zehn Jahren wurde gezeigt, dass der Motilitätsdefekt einer *pdeH*-Deletionsmutante durch die zusätzliche Deletion von *dgcE* teilweise supprimiert werden kann. Dieser Effekt wurde auf verminderte c-di-GMP-Mengen in Folge fehlender DgcE-Aktivität zurückgeführt, wodurch Motilität begünstigt wird. Interessanterweise wurden in derselben Studie zwei weitere Gene entdeckt, deren Deletion den Motilitätsdefekt einer *pdeH*-Deletionsmutante in gleichem Maße supprimieren – *yjdA* und *yjz* (Girgis et al., 2007). Diese beiden Gene bilden eine Transkriptionseinheit eines flagellaren Klasse 3 Operons und

unterliegen demnach σ^{FliA} -kontrollierter Genexpression. Das Gen *yjdA* liegt stromaufwärts des *yjcZ*-Gens und ist mit 742 Codons weitaus größer als *yjcZ*, das für lediglich 292 AS kodiert. Auf welche Art und Weise YjdA und YjcZ in die Motilität eingreifen und ob sie wie DgcE an c-di-GMP-vermittelten Prozessen beteiligt sind, wurde nicht weiter verfolgt und blieb unbekannt.

Während keinerlei Information bezüglich YjcZ existieren, wurde YjdA von Ozaki *et al.* (2013) als oligomerisierendes Homolog von BDLP (*bacterial dynamin-like protein*) aus *N. punctiforme* charakterisiert (Ozaki *et al.*, 2013). In Eukaryoten sind Dynamine GTPasen, die endocytotische Prozesse vermitteln, indem sie an der Abschnürung von Membranvesikeln beteiligt sind (Henley *et al.*, 1999). Über die Funktion von BDLPs hingegen ist außer ihrer Membranassoziation kaum etwas bekannt (Bramkamp, 2012). YjdA ist jedoch ein lösliches Protein mit einer für Dynamine typischen N-terminalen GTPase-Domäne. Für YjdA wurde bisher eine Beteiligung an der Co-Lokalisation von entstehenden DNA-Strängen während der DNA-Replikation beschrieben, weshalb es auch unter dem Namen CrfC (*colocalization of the replication fork DNA by the clamp*) bekannt ist (Ozaki *et al.*, 2013).

Die komplexe Struktur sowie die entscheidende Initiator-Rolle innerhalb der Matrix-Kontrollkaskade lässt vermuten, dass die DgcE-Aktivität durch die Integration verschiedener Signale reguliert wird, um eine akkurate zeitliche und räumliche Koordination der Matrixsynthese zu ermöglichen.

2 Zielsetzung

Das zentrale Ziel dieser Arbeit bestand in der Aufklärung der Signalwahrnehmung und Aktivitätskontrolle von DgcE sowie seinem Wirkmechanismus auf das PdeR/DgcM/MlrA-Modul, wodurch letztlich die Biofilmmatrixexpression reguliert wird. Chromosomale Mutanten, die für unterschiedliche DgcE-Varianten kodieren, sollten Aufschluss über die Funktionen einzelner Domänen liefern, wobei Auswirkungen auf die Makrokolonie-Biofilmbildung stets als erste phänotypische Anhaltspunkte dienten.

Ausgehend von einer früheren Studie, in der ein Motilitätsdefekt einer *pdeH*-Deletionsmutante durch eine zusätzliche Mutation von *dgcE*, *yjdA* und *yjcZ* in gleichem Maße kompensiert werden konnte (Girgis et al., 2007), sollte in dieser Arbeit zudem geklärt werden, ob die GTPase YjdA und das bislang uncharakterisierte Protein YjcZ (im Operon *yjdA-yjcZ* kodiert) ebenfalls an der c-di-GMP-vermittelten *csgD*-Expression beteiligt sind und an der DgcE-vermittelten Signaltransduktion mitwirken.

Zusätzlich zu YjdA und YjcZ sollten im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit Dr. A. Typas (EMBL, Heidelberg) weitere Proteine, die an der Regulation der Expression von Curli-Fimbrien beteiligt sind (RbsK, RbsR, YdcI, YieP und PuuR), auf ihre Wirkposition innerhalb der Biofilmmatrix-Kontrollkaskade untersucht werden.

Rotationsbedingte Flagellenverknötungen am nährstoffreichen Boden einer Makrokolonie tragen zur Curli-Synthese in oberen Schichten bei (Serra et al., 2013b). Im Rahmen dieser Arbeit sollte getestet werden, ob dabei ein mechanisches Signal von DgcE über seine membranständige sensorische MASE1-Domäne wahrgenommen wird und so einen aktivierenden Einfluss auf die Matrixsynthese bewirkt. Parallel sollte ein potentiell inhibierender Einfluss von Flagellenverknötungen auf die flagellare Signalkaskade und somit u. a. die PDE PdeH analysiert werden. Dabei sollten *motA*^{+/-}-Mutanten verwendet werden, die die Analyse der Biofilmbildung in An- bzw. Abwesenheit der MotA-vermittelten Flagellenrotation und -verknötung ermöglichen sollten.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Apparaturen sind Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Geräte und Apparaturen.

Gerät / Apparatur	Modell	Hersteller
Autoklav	Systec DX-150	Systec
Blotting-Apparaturen	Mini Trans-Blot® Cell EBU-302	Bio-Rad CBS Scientific
Brutschränke	B6030	Heraeus
CCD-Kamera	ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare
Elektrophoresekammern	EasyPhor	Biozym
Elektroporator	GenePulser Xcell	Bio-Rad
Geldokumentations-geräte	Alpha Imager HP, Multiimage II	Alpha Innotech
	ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare
Heizblöcke	Thermomixer comfort	Eppendorf
Horizontalschüttler	Innova 2000	New Brunswick Scientific
Kameras	EOS 300D	Canon
Luftschüttler	Innova 43	New Brunswick Scientific
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph
Microplate reader	Synergy H1	BioTek
Nanodrop	NanoDrop 2000	Peqlab
PCR-Thermocycler	Arktik Thermal Cycler	Thermo Scientific
pH-Meter	Lab 850	SI Analytics
Photometer	GeneQuant 100	GE Healthcare
Rollschüttler	RSM7	Ratek
Spannungsgeber	PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad
Speed-Vac	Speed Vac Plus SC110A	Thermo Savant
Stereomikroskop	Stemi 2000-C	Zeiss
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Schüttelwasserbad	1092	GFL
Zentrifugen	5810R, 5427R, MiniSpin plus	Eppendorf
	Sorvall LYNX 4000 Superspeed Centrifuge	Thermo Scientific

3.2 Chemikalien

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt, D), Bio-Rad (München, D), Biozym (Hessisch-Oldendorf, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Difco Laboratories (Augsburg, D), Eppendorf (Hamburg, D), GATC (Konstanz, D), GE Healthcare (Freiburg, D), IBA (Göttingen, D), Merck (Darmstadt, D), Metabion (Steinkirchen, D), New England Biolabs (Frankfurt am Main, D), Promega (Mannheim, D), Qiagen (Hilden, D), Roboklon (Berlin, D), Roche (Berlin, D), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D).

3.3 Nährmedien

Die Sterilisation aller Medien erfolgte in der Regel durch Autoklavieren (vgl. 3.5.1). Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden zunächst mithilfe von Filtern der Porengröße 0,2 µm (Milipore) sterilfiltriert und anschließend zu den auf mindestens 50°C heruntergekühlten Medien zugegeben.

3.3.1 Flüssigmedien

LB-Medium (Lysogeny broth)	Bacto Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	ddH ₂ O	ad 1 l
LBnoS Medium (LB ohne Salz)	LB-Medium ohne Zugabe von NaCl	
SOB-Medium	Bacto Trypton	20 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,5 g
	KCl	0,19 g
	ddH ₂ O	ad 1 l
SOC-Medium	SOB-Medium supplementiert mit:	
	MgCl ₂	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	Glukose	20 mM
10xM9-Medium	Na ₂ HPO ₄	75 g
	KH ₂ PO ₄	30 g
	NaCl	5 g
	NH ₄ Cl	10 g
	ddH ₂ O	ad 1 l

3.3.2 Festmedien

LB-Agar	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Span-Agar	18 g
	ddH ₂ O	ad 1 l

LBnoS-Agar (LB ohne Salz) LB-Agar ohne Zugabe von NaCl

Sofern die Platten für die Herstellung von Makrokolonien (vgl. 3.5.7) verwendet wurden, wurden sie bei RT gelagert und unmittelbar vor Nutzung mit halb geöffnetem Deckel für 45 min bei 28°C getrocknet.

X-Gal-Agarplatten LB-Agar supplementiert mit:
X-Gal (gelöst in DMF, sterilfiltriert) 40 mg/l

Kongorot (CR)-Platten LBnoS-Agar 1 l
Kongorot-Lösung 10 ml
Kongorot-Lösung (in 70% Ethanol, sterilfiltriert):
Kongorot 2 mg/ml
Coomassie Brilliant Blue G 1 mg/ml

Der autoklavierte LBnoS-Agar wurde auf eine Temperatur von 50°C heruntergekühlt, bevor die Kongorot-Lösung zugegeben wurde. Die Platten wurden bei RT gelagert und unmittelbar vor Nutzung mit halb geöffnetem Deckel für 45 min bei 28°C getrocknet.

MacConkey-Platten MacConkey Agar (Roth) 50 g
Maltose 1 %
Ampicillin 100 µg/ml
Kanamycin 50 µg/ml
ddH₂O ad 1 l

M9-Rhamnoseplatten 10xM9 100 ml
CaCl₂ 0,1 mM
MgSO₄ 1 mM
Rhamnose 0,5 %
ddH₂O ad 1 l

3.3.3 Antibiotikazusätze

Die Zugabe von Antibiotika zu Flüssig- und Festmedien ist Tab. 3 zu entnehmen und erfolgte erst, sobald die Medien auf mindestens 50°C heruntergekühlt worden sind. Die Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

Tab. 3: Antibiotika und deren Konzentrationen.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml ddH ₂ O	100 µg/ml
Chloramphenicol	15 mg/ml 70% Ethanol	15 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml ddH ₂ O	50 µg/ml

3.4 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

3.4.1 Bakterienstämme

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind Tab. 4 zu entnehmen. Die „scar“-Mutationen entsprechen Gendeletionen, bei denen die mittels Ein-Schritt-Inaktivierung (vgl. 3.6.14) eingefügte Antibiotika-Resistenzkassette entfernt wurde, wodurch eine ca. 80 bp umfassende Narbe (mit FRT) generiert wurde.

Tab. 4: Verwendete Bakterienstämme. Sämtliche Nukleotid (nt)- und Aminosäureangaben (AS) beinhalten das Startcodon der kodierenden Gensequenz.

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
AP393	W3110 <i>clpX::cm</i>	Laborsammlung
AP394	W3110 <i>lon::kan</i>	Laborsammlung
AP395	W3110 <i>clpA::cm</i>	Laborsammlung
AP489	AR3110 <i>ydcl::kan</i>	Laborsammlung
AP491	AR3110 <i>puuR::scar</i>	Laborsammlung
AR187	AR3110 <i>rpoS::scar</i>	(Serra et al., 2013b)
AR188	AR3110 <i>csgD::scar</i>	(Serra et al., 2013b)
AR190	AR3110 <i>pdeH::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR192	AR3110 <i>pdeR::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR199	AR3110 <i>dgcE::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
AR395	AR3110 <i>yjdA::scar</i>	Laborsammlung
AR396	AR3110 <i>yjcZ::scar</i>	Laborsammlung

AR398	AR3110 <i>dgcM::scar ; pdeR::scar</i>	A. Richter (Dissertation, 2016)
AR3289	W3110 <i>zad220::Tn10, sfhC21</i> (Kontrollstamm für AR3291)	erhalten von AG Narberhaus
AR3291	W3110 <i>zad220::Tn10 sfhC21 ΔftsH3::kan</i>	
AR3110	W3110 <i>bcsQ</i> *6L (Cellulose-positiv)	(Serra et al., 2013a)
GB920s	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
GB1100	W3110 <i>Δlac(I-A)::scar λRS45 csgB(-190,+43)::lacZ</i> (hybrid)	(Serra et al., 2015)
GB1107s	GB1100 <i>dgcM::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
GB1109s	GB1100 <i>dgcE::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
GK938	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; lon::kan</i>	Laborsammlung
KL25	W3110 <i>Δlac(I-A)::scar λRS45 fliA::lacZ</i>	Laborsammlung
KL44	GB1100 <i>pdeH::scar</i>	(Sarenko et al., 2017)
OS143	W3110 <i>hsIVU::kan</i>	Laborsammlung
NS256	W3110 <i>Δlac(I-A)::scar IRS45 pdeH::lacZ</i> (hybrid)	(Sommerfeldt et al., 2009)
NS350	W3110 <i>pdeH::scar</i>	Laborsammlung
NS351	W3110 <i>dgcE::scar</i>	Laborsammlung
NS403	W3110 <i>Δlac(I-A)::scar ; flhDC(-1956,+46)::lacZ</i>	(Sommerfeldt et al., 2009)
TJ2	W3110 <i>clpP::kan</i>	Laborsammlung
VP3	AR3110 <i>pdeH::scar ; motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP6	AR3110 <i>motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP17	GB1100 <i>motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP22	GB1100 <i>dgcE::scar ; motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP24	GB1100 <i>dgcE::scar ; dgcM::scar</i>	Diese Arbeit
VP49	GB1100 <i>yjdA::scar</i>	Diese Arbeit
VP50	GB1100 <i>yjcZ::scar</i>	Diese Arbeit
VP51	AR3110 <i>dgcE::scar ; yjdA::scar</i>	Diese Arbeit
VP52	AR3110 <i>dgcE::scar ; yjcZ::scar</i>	Diese Arbeit
VP68	GB1100 (<i>yjdA-yjcZ</i>)::scar	Diese Arbeit
VP69	AR3110 (<i>yjdA-yjcZ</i>)::scar	Diese Arbeit
VP70	AR3110 <i>dgcE::scar ; pdeH::scar</i>	Diese Arbeit
VP71	AR3110 <i>yjdA::scar ; pdeH::scar</i>	Diese Arbeit
VP72	AR3110 <i>yjcZ::scar ; pdeH::scar</i>	Diese Arbeit
VP76	AR3110 <i>dgcE::scar ; pdeR::kan</i>	Diese Arbeit
VP79	AR3110 <i>yjcZ::scar ; pdeR::kan</i>	Diese Arbeit
VP81	AR3110 <i>yjdA::scar ; pdeR::kan</i>	Diese Arbeit
VP82	AR3110 (<i>yjdA-yjcZ</i>)::kan ; <i>pdeR::scar</i>	Diese Arbeit
VP84	AR3110 (<i>yjdA-yjcZ</i>)::kan ; <i>pdeH::scar</i>	Diese Arbeit
VP89	W3110 <i>motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP91	W3110 (<i>yjdA-yjcZ</i>)::scar	Diese Arbeit
VP92	AR3110 <i>dgcE::scar ; (yjdA-yjcZ)::scar</i>	Diese Arbeit
VP94	W3110 <i>dgcE::kan/ccdB</i> (<i>dgcE</i> durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit

VP95	AR3110 <i>dgcE::kan/ccdB</i> (<i>dgcE</i> durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP96	GB1100 <i>dgcE::kan/ccdB</i> (<i>dgcE</i> durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP103	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; yjdA::scar</i>	Diese Arbeit
VP104	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; yjcZ::scar</i>	Diese Arbeit
VP105	W3110 <i>dgcE::scar ; motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP107	W3110 <i>pdeH::scar ; motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP111	W3110 (<i>yjdA-yjcZ</i>)::scar ; <i>motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP117	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
VP118	GB1100 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
VP126	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105) ; <i>yjdA::scar</i>	Diese Arbeit
VP127	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105) ; <i>yjcZ::scar</i>	Diese Arbeit
VP128	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105) ; (<i>yjdA-yjcZ</i>)::scar	Diese Arbeit
VP132	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; (yjdA-yjcZ)::kan</i>	Diese Arbeit
VP151	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105) ; <i>pdeH::kan</i>	Diese Arbeit
VP152	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105) ; <i>pdeR::kan</i>	Diese Arbeit
VP154	W3110 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
VP166	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} (ΔAS 300-680)	Diese Arbeit
VP174	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} (ΔAS 300-680) ; <i>pdeH::kan</i>	Diese Arbeit
VP180	W3110 <i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} (ΔAS 300-680)	Diese Arbeit
VP181	W3110 <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} (ΔAS 855-1105)::3xFLAG::scar	Diese Arbeit
VP187	W3110 <i>TM</i> ^{DgcE} :: <i>kan/ccdB</i> (nt 1-897 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP188	W3110 <i>TM</i> ^{dgcEΔEAL} :: <i>kan/ccdB</i> (nt 1-897 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP206	GB1100 <i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} (ΔAS 300-680)	Diese Arbeit
VP207	AR3110 <i>TM</i> ^{DgcE} :: <i>kan/ccdB</i> (nt 1-897 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP208	GB1100 <i>TM</i> ^{DgcE} :: <i>kan/ccdB</i> (nt 1-897 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP223	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} (ΔAS 300-680) ; <i>pdeR::kan</i>	Diese Arbeit
VP244	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; yhjJ::kan</i>	Diese Arbeit
VP257	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; ptrA::scar</i>	Diese Arbeit
VP261	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; pqqL::scar</i>	Diese Arbeit
VP277	AR3110 <i>TM</i> ^{dgcEΔEAL} :: <i>kan/ccdB</i> (nt 1-897 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP278	GB1100 <i>TM</i> ^{dgcEΔEAL} :: <i>kan/ccdB</i> (nt 1-897 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP280	AR3110 <i>dgcE::scar ; motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP282	AR3110 (<i>yjdA-yjcZ</i>)::scar ; <i>motA::scar</i>	Diese Arbeit
VP296	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; yegH::kan</i>	Diese Arbeit
VP312	W3110 <i>GGDEF</i> ^{DgcE} :: <i>kan/ccdB</i> (nt 2135-2535 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP315	W3110 <i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} (ΔAS 300-680)::3xFLAG::scar	Diese Arbeit
VP317	AR3110 <i>GGDEF</i> ^{DgcE} :: <i>kan/ccdB</i> (nt 2135-2535 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP318	GB1100 <i>GGDEF</i> ^{DgcE} :: <i>kan/ccdB</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

	(nt 2135-2535 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	
VP336	W3110 <i>dgcE</i> ^{GGAFF} (D763A / E764A)	Diese Arbeit
VP337	W3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (ΔAS 2-291)	Diese Arbeit
VP338	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (ΔAS 2-291)	Diese Arbeit
VP339	GB1100 <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (ΔAS 2-291)	Diese Arbeit
VP344	W3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} (ΔAS 2-291 & ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
VP345	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} (ΔAS 2-291 & ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
VP346	GB1100 <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} (ΔAS 2-291 & ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
VP352	W3110 <i>dgcE</i> ::3xFLAG::scar ; <i>motA</i> ::scar	Diese Arbeit
VP353	NS256 <i>motA</i> ::scar	Diese Arbeit
VP356	W3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTM} ::3xFLAG::scar	Diese Arbeit
VP357	W3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} ::3xFLAG::scar	Diese Arbeit
VP358	GB1100 <i>dgcE</i> ^{GGAFF} (D763A / E764A)	Diese Arbeit
VP363	AR3110 <i>dgcE</i> ^{GGAFF} (D763A / E764A)	Diese Arbeit
VP367	AR3110 <i>yieP</i> ::scar	Diese Arbeit
VP377	KL25 <i>motA</i> ::scar	Diese Arbeit
VP378	NS403 <i>motA</i> ::scar	Diese Arbeit
VP386	AR3110 <i>dgcM</i> ::scar ; <i>pdeR</i> ::scar ; <i>yjdA</i> ::scar	Diese Arbeit
VP387	AR3110 <i>dgcM</i> ::scar ; <i>pdeR</i> ::scar ; <i>yjcZ</i> ::scar	Diese Arbeit
VP394	AR3110 <i>dgcM</i> ::scar ; <i>pdeR</i> ::scar ; <i>ydcl</i> ::kan	Diese Arbeit
VP396	W3110 (TM1+2 = AS 1-67) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)	Diese Arbeit
VP397	AR3110 (TM1+2 = AS 1-67) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)	Diese Arbeit
VP398	GB1100 (TM1+2 = AS 1-67) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)	Diese Arbeit
VP399	AR3110 <i>rbsK</i> ::scar	Diese Arbeit
VP400	AR3110 <i>rbsR</i> ::scar	Diese Arbeit
VP402	AR3110 <i>dgcM</i> ::scar ; <i>pdeR</i> ::scar ; <i>yieP</i> ::scar	Diese Arbeit
VP403	AR3110 <i>dgcM</i> ::scar ; <i>pdeR</i> ::scar ; <i>rbsK</i> ::scar	Diese Arbeit
VP404	AR3110 <i>dgcM</i> ::scar ; <i>pdeR</i> ::scar ; <i>rbsR</i> ::scar	Diese Arbeit
VP408	AR3110 <i>dgcM</i> ::scar ; <i>pdeR</i> ::scar ; <i>puuR</i> ::scar	Diese Arbeit
VP416	AR3110 <i>dgcM</i> ::scar ; <i>pdeR</i> ::scar ; <i>dgcE</i> ::scar	Diese Arbeit
VP420	W3110 <i>hflC</i> ::kan	Diese Arbeit
VP421	W3110 <i>hflK</i> ::kan	Diese Arbeit
VP428	GB1100 <i>rbsK</i> ::scar	Diese Arbeit
VP429	GB1100 <i>rbsR</i> ::scar	Diese Arbeit
VP430	GB1100 <i>yieP</i> ::scar	Diese Arbeit
VP431	GB1100 <i>puuR</i> ::scar	Diese Arbeit
VP438	AR3110 <i>dgcE</i> ::scar ; <i>cpxR</i> ::kan	Diese Arbeit
VP439	AR3110 <i>yjdA</i> ::scar ; <i>cpxR</i> ::kan	Diese Arbeit
VP440	AR3110 <i>yjcZ</i> ::scar ; <i>cpxR</i> ::kan	Diese Arbeit
VP441	AR3110 <i>rbsK</i> ::scar ; <i>cpxR</i> ::kan	Diese Arbeit
VP442	AR3110 <i>rbsR</i> ::scar ; <i>cpxR</i> ::kan	Diese Arbeit
VP443	AR3110 <i>yieP</i> ::scar ; <i>cpxR</i> ::kan	Diese Arbeit
VP444	AR3110 <i>ydcl</i> ::scar ; <i>cpxR</i> ::kan	Diese Arbeit
VP445	AR3110 <i>puuR</i> ::scar ; <i>cpxR</i> ::kan	Diese Arbeit
VP446	W3110 (TM1+2 = AS 1-67) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)::3xFLAG::scar	Diese Arbeit

VP449	AR3110 <i>cpxR::kan</i>	Diese Arbeit
VP450	W3110 <i>htpX::kan</i>	Diese Arbeit
VP454	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; hflC::kan</i>	Diese Arbeit
VP455	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; hflK::kan</i>	Diese Arbeit
VP458	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; htpX::kan</i>	Diese Arbeit
VP460	GB1100 <i>ydcl::kan</i>	Diese Arbeit
VP462	W3110 <i>glpG::kan</i>	Diese Arbeit
VP464	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; glpG::kan</i>	Diese Arbeit
VP466	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)::3xFLAG::scar ; <i>glpG::kan</i>	Diese Arbeit
VP467	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} (= AS 292-854)	Diese Arbeit
VP468	AR3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} (= AS 292-854)	Diese Arbeit
VP469	GB1100 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} (= AS 292-854)	Diese Arbeit
VP470	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar</i>	Diese Arbeit
VP476	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar ; ydcl::kan</i>	Diese Arbeit
VP479	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar ; dgcE::scar</i>	Diese Arbeit
VP480	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar ; yjdA::scar</i>	Diese Arbeit
VP481	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar ; yjcZ::scar</i>	Diese Arbeit
VP482	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar ; rbsK::scar</i>	Diese Arbeit
VP483	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar ; rbsR::scar</i>	Diese Arbeit
VP484	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar ; yieP::scar</i>	Diese Arbeit
VP485	AR3110 <i>mlrA::3xFLAG::scar ; puuR::scar</i>	Diese Arbeit
VP490	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} (= AS 292-854)::3xFLAG::scar	Diese Arbeit
VP497	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; pdeH::kan</i>	Diese Arbeit
VP507	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTM} ; <i>pdeH::kan</i>	Diese Arbeit
VP508	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} ; <i>pdeH::kan</i>	Diese Arbeit
VP509	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL} ; <i>pdeR::kan</i>	Diese Arbeit
VP510	AR3110 <i>dgcE</i> ^{GGAAF} ; <i>pdeH::kan</i>	Diese Arbeit
VP514	AR3110 <i>dgcE</i> ^{ΔTM} ; <i>pdeR::kan</i>	Diese Arbeit
VP515	AR3110 <i>dgcE</i> ^{GGAAF} ; <i>pdeR::kan</i>	Diese Arbeit
VP520	W3110 <i>yjdA::kan/ccdB</i> (nt 7-1005 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP521	AR3110 <i>yjdA::kan/ccdB</i> (nt 7-1005 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP522	GB1100 <i>yjdA::kan/ccdB</i> (nt 7-1005 durch <i>kan/ccdB</i> -Kassette ersetzt)	Diese Arbeit
VP526	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)::3xFLAG::scar ; <i>htpX::kan</i>	Diese Arbeit
VP527	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)::3xFLAG::scar ; <i>hflK::kan</i>	Diese Arbeit
VP528	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)::3xFLAG::scar ; <i>hflC::kan</i>	Diese Arbeit
VP529	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)::3xFLAG::scar ; <i>clpP::kan</i>	Diese Arbeit
VP530	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (= AS 292-1105)::3xFLAG::scar ; <i>lon::kan</i>	Diese Arbeit
VP531	W3110 <i>yjdA</i> T103D	Diese Arbeit

VP532	AR3110 <i>yjdA</i> T103D	Diese Arbeit
VP533	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; clpP::kan</i>	Diese Arbeit
VP534	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; clpA::cm</i>	Diese Arbeit
VP535	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; clpX::cm</i>	Diese Arbeit
VP536	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; hslVU::kan</i>	Diese Arbeit
VP537	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} <i>dgcE^{ΔTM}</i> (= AS 292-1105) <i>::3xFLAG::scar ; clpA::kan</i>	Diese Arbeit
VP538	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} <i>dgcE^{ΔTM}</i> (= AS 292-1105) <i>::3xFLAG::scar ; clpX::kan</i>	Diese Arbeit
VP539	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} <i>dgcE^{ΔTM}</i> (= AS 292-1105) <i>::3xFLAG::scar ; hslVU::kan</i>	Diese Arbeit
VP540	W3110 <i>qmcA::kan</i>	Diese Arbeit
VP542	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; qmcA::kan</i>	Diese Arbeit
VP543	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} <i>dgcE^{ΔTM}</i> (= AS 292-1105) <i>::3xFLAG::scar ; qmcA::kan</i>	Diese Arbeit
VP544	W3110 <i>ycbZ::kan</i>	Diese Arbeit
VP546	W3110 <i>dgcE::3xFLAG::scar ; ycbZ::kan</i>	Diese Arbeit
VP547	W3110 (<i>TM1+2 = AS 1-67</i>) ^{LacY} <i>dgcE^{ΔTM}</i> (= AS 292-1105) <i>::3xFLAG::scar ; ycbZ::kan</i>	Diese Arbeit
VP551	W3110 <i>yjdA::3xFLAG::scar</i>	Diese Arbeit
VP552	W3110 <i>dgcE^{ΔMASE1}</i> (= AS 1-3 :: AS 229-3315)	Diese Arbeit
VP553	AR3110 <i>dgcE^{ΔMASE1}</i> (= AS 1-3 :: AS 229-3315)	Diese Arbeit
VP557	W3110 <i>yjdA T103D::3xFLAG::scar</i>	Diese Arbeit
VP558	W3110 <i>dgcE^{ΔMASE1}</i> (= AS 1-3 :: AS 229-3315) <i>::3xFLAG::scar</i>	Diese Arbeit
VP559	GB1100 <i>yjdA</i> T103D	Diese Arbeit
W3110	<i>E. coli</i> K-12 <i>thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)I</i>	(Hayashi et al., 2006)
XL-1 Blue	F':Tn10 <i>proA+B+lacIq D(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (rk-mk+) glnV44 relA1 lac</i>	NEB

3.4.2 Bakteriophagen

Als transduzierender Phage für den Transfer genomischer DNA auf einen Rezipienten-Stamm wurde der P1_{vir}-Bakteriophage aus der Laborsammlung verwendet.

3.4.3 Plasmide

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind Tab. 5 zu entnehmen.

Tab. 5: Verwendete Plasmide. Sämtliche Aminosäureangaben (AS) beinhalten das Startcodon der kodierenden Gensequenz.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCAB18	IPTG-induzierbarer Niedrigkopie-Vektor mit <i>ptac</i> -kontrollierter MCS; Amp ^R	(Barembach and Hengge, 2007)

Material und Methoden

pCP20	Helferplasmid mit FLP-Rekombinase; hitzeinduzierbarer Promotor; temperatursensitives <i>ori</i> ; Amp ^R ; Cm ^R	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD3	Template-Plasmid zur Amplifikation der FRT-flankierten <i>cm</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp ^R ; Cm ^R	
pKD4	Template-Plasmid zur Amplifikation der FRT-flankierten <i>kan</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp ^R ; Kan ^R	
pKD13	Template-Plasmid zur Amplifikation der FRT-flankierten <i>kan</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp ^R ; Kan ^R	
pKD46	Helferplasmid mit λ -Red-Rekombinase-System; Arabinose-induzierbarer Promotor (<i>ParaB</i> - γ - β - <i>exo</i>); temperatursensitives <i>ori</i> ; Amp ^R	
pKD45	Template-Plasmid zur Amplifikation der FRT-flankierten <i>kan</i> -und <i>ccdB</i> -Kassette; Rhamnose-induzierbares <i>ccdB</i> -Toxin; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp ^R ; Kan ^R	Laborsammlung, von AG Wanner erhalten
pSUB11	Template-Plasmid zur Amplifikation der FRT-flankierten 3xFLAG:: <i>kan</i> -Kassette; <i>pir</i> -abhängiges <i>oriRy</i> ; Amp ^R ; Kan ^R	(Uzzau et al., 2001)
pKT25	Niedrigkopie-Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit N-terminalem T25-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussens</i> ; <i>lac</i> -Promotor; Kan ^R	(Karimova et al., 1998) von AG Jenal & AG Sourjik erhalten
pKNT25	Niedrigkopie-Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit C-terminalem T25-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussens</i> ; <i>lac</i> -Promotor; Kan ^R	
pUT18	Hochkopie-Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit C-terminalem T18-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussens</i> ; <i>lac</i> -Promotor; Amp ^R	
pUT18C	Hochkopie-Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit N-terminalem T18-Fragment der Adenylatzyklase von <i>B. pertussens</i> ; <i>lac</i> -Promotor; Amp ^R	
pKT25- <i>zip</i>	pKT25-Leucine-Zipper; Kontroll-Plasmid BTH; Kan ^R	
pUT18C- <i>zip</i>	pUT18C-Leucine-Zipper; Kontroll-Plasmid BTH; Amp ^R	
pDP9	pKNT25_ <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (Δ AS 1-290)	Diego Penilla (Bachelorarbeit)
pDP15	pUT18_ <i>GGDEF-EAL</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 681-1105)	Diego Penilla (Bachelorarbeit)
pDP16	pKNT25_ <i>GGDEF-EAL</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 681-1105)	Diego Penilla (Bachelorarbeit)
pDP17	pUT18_ <i>TM-PAS3</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 2-701)	Diego Penilla (Bachelorarbeit)
pDP18	pKNT25_ <i>TM-PAS3</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 2-701)	Diego Penilla (Bachelorarbeit)
pNAT8	pUT18_ <i>dgcC</i>	Doktorarbeit N. Tschowri
pVP11	pKT25_ <i>dgcE</i>	Diese Arbeit
pVP12	pKT25_ <i>yjdA</i>	Diese Arbeit
pVP13	pKT25_ <i>yjcZ</i>	Diese Arbeit
pVP15	pUT18_ <i>dgcE</i>	Diese Arbeit

Material und Methoden

pVP16	pUT18_ <i>yjdA</i>	Diese Arbeit
pVP17	pUT18_ <i>yjcZ</i>	Diese Arbeit
pVP18	pUT18_ <i>pdeR</i>	Diese Arbeit
pVP20	pUT18C_ <i>dgcE</i>	Diese Arbeit
pVP21	pUT18C_ <i>yjdA</i>	Diese Arbeit
pVP22	pUT18C_ <i>yjcZ</i>	Diese Arbeit
pVP23	pUT18C_ <i>pdeR</i>	Diese Arbeit
pVP26	pKT25_ <i>motA</i>	Diese Arbeit
pVP27	pUT18C_ <i>motA</i>	Diese Arbeit
pVP28	pKT25_ <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (ΔAS 1-290)	Diese Arbeit
pVP29	pUT18_ <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (ΔAS 1-290)	Diese Arbeit
pVP30	pUT18C_ <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (ΔAS 1-290)	Diese Arbeit
pVP31	pKT25_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{EAL}} (ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
pVP32	pKT25_ <i>TM</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 2-298)	Diese Arbeit
pVP33	pUT18C_ <i>TM</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 2-298)	Diese Arbeit
pVP34	pKT25_ <i>EAL</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 850-1105)	Diese Arbeit
pVP35	pUT18_ <i>EAL</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 850-1105)	Diese Arbeit
pVP36	pUT18C_ <i>EAL</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 850-1105)	Diese Arbeit
pVP45	pUT18C_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{EAL}} (ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
pVP46	pKNT25_ <i>dgcE</i>	Diese Arbeit
pVP47	pKNT25_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{EAL}} (ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
pVP48	pKNT25_ <i>TM</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 2-298)	Diese Arbeit
pVP49	pKNT25_ <i>yjdA</i>	Diese Arbeit
pVP50	pCAB18_ <i>dgcE</i> ::6His	Diese Arbeit
pVP51	pCAB18_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{EAL}} (ΔAS 855-1105)::6His	Diese Arbeit
pVP52	pCAB18_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{PAS3}} (ΔAS 300-680)::6His	Diese Arbeit
pVP55	pCAB18_ <i>dgcE</i> ^{GGAAF} (D763A / E764A)::6His	Diese Arbeit
pVP57	pUT18_ <i>PAS3</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 296-700)	Diese Arbeit
pVP58	pUT18_ <i>PAS3-GGDEF</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 296-848)	Diese Arbeit
pVP59	pUT18_ <i>GGDEF</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 709-848)	Diese Arbeit
pVP60	pKNT25_ <i>GGDEF</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 709-848)	Diese Arbeit
pVP61	pKNT25_ <i>PAS3</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 296-700)	Diese Arbeit
pVP62	pKNT25_ <i>PAS3-GGDEF</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 296-848)	Diese Arbeit
pVP63	pKNT25_ <i>motA</i>	Diese Arbeit
pVP64	pUT18_ <i>TM</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 2-298)	Diese Arbeit
pVP65	pUT18_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{EAL}} (ΔAS 855-1105)	Diese Arbeit
pVP66	pKNT25_ <i>EAL</i> ^{<i>DgcE</i>} (AS 850-1105)	Diese Arbeit
pVP67	pKNT25_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{PAS3}} (ΔAS 300-680)	Diese Arbeit
pVP68	pUT18_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{PAS3}} (ΔAS 300-680)	Diese Arbeit
pVP69	pKNT25_ <i>pdeR</i>	Diese Arbeit
pVP70	pKNT25_ <i>yjcZ</i>	Diese Arbeit
pVP71	pUT18_ <i>motA</i>	Diese Arbeit
pVP72	pKNT25_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{GGDEF}} (ΔAS 713-845)	Diese Arbeit
pVP73	pUT18_ <i>dgcE</i> ^{Δ^{GGDEF}} (ΔAS 713-845)	Diese Arbeit

pVP82	pCAB18_ <i>EAL</i> ^{DgcE} (AS 848-1105)::6 <i>His</i>	Diese Arbeit
pVP84	pCAB18_ <i>dgcE</i>	Diese Arbeit
pVP85	pCAB18_ <i>yjdAT103D-yjcZ</i>	Diese Arbeit
pVP86	pCAB18_ <i>yjdA-yjcZ</i>	Diese Arbeit
pVP102	pCAB18_ <i>dgcE</i> ^{ΔMASE1} (ΔAS 4-228)::6 <i>His</i>	Diese Arbeit
pVP105	pCAB18_ <i>dgcE</i> ^{ΔTM} (ΔAS 4-291)::6 <i>His</i>	Diese Arbeit
pVP106	pCAB18_(<i>TM1+2</i>) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM} ::6 <i>His</i> = AS ^{DgcE} ₁₋₃ :: AS ^{LacY} ₂₋₆₇ :: AS ^{DgcE} ₂₉₂₋₁₁₀₅ ::6 <i>His</i>	Diese Arbeit
pVP111	pKT25_ <i>yjdAT103D</i>	Diese Arbeit
pVP112	pKNT25_ <i>yjdAT103D</i>	Diese Arbeit
pVP113	pUT18_ <i>yjdAT103D</i>	Diese Arbeit

3.5 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

3.5.1 Sterilisation

Die Sterilisation von Medien und Lösungen erfolgte durch feuchtes Autoklavieren für 20 min bei 121°C und 1 bar. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mithilfe von Filtern der Porengröße 0,2 µm (Roth) sterilfiltriert. Glaswaren wurden bei 180°C für 8 h trocken sterilisiert.

3.5.2 Bakterienkultivierung

Die Anzucht von Bakterienstämmen in Flüssigmedien erfolgte in Reagenzgläsern oder Glaskolben bei 28°C bzw. 37°C im Rollinkubator, Wasserbad oder Luftschüttler unter aeroben Bedingungen bei 130-300 rpm, wobei die Kulturgefäße bis maximal 20% befüllt wurden. Wachstum auf Festmedien erfolgte, sofern nicht anders angegeben, im Brutschrank bei 28°C bzw. 37°C.

3.5.3 Bestimmung der bakteriellen Zelldichte

Die Zelldichte von Bakterien in Flüssigmedium wurde durch das Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD₅₇₈) ermittelt, wobei steriles Wachstumsmedium als Referenzwert diente. Ab einer OD₅₇₈ > 0,3 wurde die Kultur entsprechend verdünnt, um Linearität des Verhältnisses zwischen Zellzahl und OD₅₇₈ zu gewährleisten. Für die Zellzahlbestimmung von 1 d und 2 d alten Makrokolonien wurden diese zunächst in 1x Z-Puffer (Rezept vgl. 3.9.1) vollständig resuspendiert. Die so

hergestellte Suspension wurde ggf. in 1x Z-Puffer verdünnt und auf oben beschriebene Weise für die OD₅₇₈-Messung herangezogen.

3.5.4 Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Für eine langfristige Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurde eine in LB-Medium hergestellte Übernachtskultur mit einer Endkonzentration von 7 % DMSO versetzt und in Cryoröhrchen (Roth) bei -80°C gelagert. Die Lagerung von Stämmen auf Festmedien erfolgte bei 4°C für maximal 3 Tage.

3.5.5 Herstellung eines P1-Lysates

Ein Spender-Bakterienstamm wurde in 5 ml LB-Medium für 2-3 h bei 37°C angezogen, woraufhin die Kultur mit einem Tropfen 1 M CaCl₂ und mehreren Tropfen *E. coli* P1_{vir}-Wildtyplysate (aus W3110 bzw. AR3110) versetzt wurde. Die anschließende Zelllyse erfolgte für 4-8 h bei 37°C. Um restliche nicht-lysierte Zellen abzutöten, wurde die Kultur mit 10 Tropfen Chloroform versetzt, gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Nach der Trennung von Phagen und bakteriellen Zelltrümmern mittels Zentrifugation für 15 min bei 5000 rpm wurde der Überstand in ein steriles Schraubdeckelglasröhrchen überführt, mit 3 Tropfen Chloroform versetzt und bei 4°C gelagert. Das so hergestellte P1_{vir}-Lysat enthält ca. 99% P1-Phagen, die virale DNA tragen, aber auch ca. 1 % Phagen, die bakterielle DNA tragen.

3.5.6 P1-Transduktion

Zur Übertragung chromosomaler DNA von einem Donor (Spender)- auf einen Rezipienten (Empfänger)-Stamm kann man sich den als Transduktion beschriebenen Gentransfer zwischen Bakterien und Viren zunutze machen (Miller, 1972, 1992). Zu diesem Zweck wurde zunächst ein zu transduzierender Bakterienstamm in 3-5 ml LB-Medium für 2-3 h bis zu einer OD₅₇₈ ≈ 0,3 bei 37°C angezogen. Nach Zugabe von 1 Tropfen 1 M CaCl₂ wurden 500 µl Bakterienkultur in ein steriles Glasröhrchen überführt und mit mehreren Tropfen eines aus einem Spender-Stamm generierten P1_{vir}-Lysates (vgl. 3.5.5) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurde die Bakterienkultur mit 1 Tropfen einer 1 M Natriumcitrat-Lösung versetzt, bei 37°C für 1 h geschüttelt, auf einer geeigneten Natriumcitrat- und Antibiotika-haltigen Selektionsplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe des P1_{vir}-Lysates.

3.5.7 Analyse von Biofilmbildung auf Festmedien (Makrokolonien)

Für die Analyse von Biofilmen in Form von Makrokolonien mithilfe von biochemischen Methodiken wurden 5 µl einer Übernachtskultur des zu testenden Stammes auf LB-Agarplatten ohne Salz (LBnoS, vgl. 3.3.2) getropft. Nach dem vollständigen Trocknen der Tropfen wurden die Platten für 1-2 Tage in einem 28°C-Inkubator bebrütet und anschließend für β -Galaktosidase-Aktivitätstests (vgl. 3.9.1) oder Proteinprobenentnahmen (vgl. 3.7.1) herangezogen.

Für die Visualisierung von Makrokolonien wurden Kongorotplatten (vgl. 3.3.2) verwendet, da der Zusatz von Kongorot und Coomassie Brilliant Blue G extrazelluläre Matrixkomponenten anfärbt und somit verbesserte Rückschlüsse auf Biofilmbestandteile erlaubt. Die Inkubation erfolgte für 5 Tage in einem 28°C-Inkubator, bevor die Kolonien mithilfe eines Stereomikroskops fotografiert wurden.

3.6 DNA-basierte Methoden für Klonierungen und chromosomale Mutationen

3.6.1 Isolierung chromosomaler DNA

Nachdem 200 µl einer *E. coli* Übernachtskultur abzentrifugiert worden sind, wurde das Pellet in 100 µl ddH₂O resuspendiert und zwecks Zellyse für 5 min gekocht. Nach der Trennung von Zelltrümmern und löslichen Bestandteilen mittels Zentrifugation wurde Chloroform hinzugegeben, um die DNA von den restlichen löslichen Bestandteilen zu trennen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm wurde die wässrige DNA-haltige Phase abgenommen und bei -20°C gelagert.

3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgte mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit (Analytik Jena) nach Angaben des Herstellers.

3.6.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Um die Konzentration von gereinigten Plasmiden oder chromosomalen PCR-Fragmenten zu bestimmen, wurden die entsprechenden Proben mithilfe eines Nanodrops analysiert. Dabei

entspricht eine $OD_{260} = 1$ einer dsDNA-Konzentration von 50 µl/ml. Anhand des Verhältnisses OD_{260}/OD_{280} , das bei reiner DNA bei 1,8 liegt, konnte zudem der Reinheitsgrad der Proben bestimmt werden. Eine $OD_{260}/OD_{280} = 2,0$ ist bei reiner RNA zu erwarten, wohingegen ein signifikant kleinerer Wert als 1,8 auf Kontamination der Proben durch Proteine oder Phenol hinweist.

3.6.4 DNA-Oligonukleotide

Die Sequenzen der zur Herstellung von Mutationen verwendeten DNA-Primer und - Fragmente sind Tab. 6 und Tab. 7 zu entnehmen. Die Synthese von DNA-Primern wurde bei der Firma Metabion in Auftrag gegeben. Die Inaktivierung folgender Gene ist bereits veröffentlicht: *bcsA*, *clpA*, *clpP*, *clpX*, *csgB*, *csgD*, *cyaA*, *dgcE*, *dgcM*, *lon*, *motA*, *pdeH*, *pdeR*, *rpoS* (Pesavento et al., 2008; Richter, 2016; Serra et al., 2013b; Weber et al., 2006).

Tab. 6: Verwendete Primer.

I. Primer zur Herstellung chromosomaler Deletionsmutanten mittels Ein-Schritt-Inaktivierung (vgl. 3.6.14). Großbuchstaben entsprechen den P-Sequenzen auf den Template-Plasmiden pKD4 bzw. pKD13. T-Primer dienten als Testprimer zur Überprüfung der erzeugten Mutation.

Chrom. Deletion	Primername	Primersequenz (5' → 3')
<i>cpxR</i>	H1P1_ <i>cpxR</i> _pKD13	ttagcgacgtctgatgacgtaattctgctcggaggatttaaacaGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>cpxR</i> _pKD13	accacgcaaggttttaaaccacgggtgaccatctttacgatccggcaATT CCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>cpxR</i>	cccaaaatcttctgtcgcg
	T2_ <i>cpxR</i>	ttcgacatgctgctcaatcat
<i>glpG</i>	H1P1_ <i>glpG</i> _pKD13	gcgtaacgctttatactgtcccctttgtgtggaataagcgacagcaacgGT GTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>glpG</i> _pKD13	TtataaatccctggaattatttctgtttcgcgcatgagcgaatcaacaATT CCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>glpG</i>	gtgcaggctttccatttaacc
	T2_ <i>glpG</i>	gcgtgttaaccgaactggaag
<i>hflC</i>	H1P1_ <i>hflC</i> _pKD13	cgactaccagcgtcagggggaataacgatgcgtaagtgcgtatcgcgatt atcGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>hflC</i> _pKD13	gacatccctgaggatgcggtggctttattgacctgtaccgcagtcgtataA TTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>hflC</i>	gggtggcaacctgatggttctg
	T2_ <i>hflC</i>	cgcttttcagagttacagcac
<i>hflK</i>	H1P1_ <i>hflK</i> _pKD13	ggcgtcgaaagacaacagggatcaccgcataaacaatatggagcaciaa acGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>hflK</i> _pKD13	ctggtggacgacgtgttgcctgctccactggtgtggaggaagaggctggA TTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>hflK</i>	gcatacatgctgctgccac
	T2_ <i>hflK</i>	gcagaccggctcataaacc
<i>htpX</i>	H1P1_ <i>htpX</i> _pKD13	gatgtgggtatcgcatattgcgtttttaaactgaggtaaaaagaaaattG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>htpX</i> _pKD13	cataaaaaaagcgcgtcgatcaggacgcgcttttagtattactcataAT TCCGGGGATCCGTCGACC

Material und Methoden

	T1_ <i>htpX</i>	ggcgaagcttgaaaaagccag
	T2_ <i>htpX</i>	ccattattacctccgcgcctc
<i>hsIVU</i> (Olga Sarenko)	H1P1_ <i>hsIVU</i> _pKD4	gctcgtgacaactatagtaagcgtagccgtGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P2_ <i>hsIVU</i> _pKD4	cgcgattataggataaaaacggctcagatctCATATGAATATCCTCCTTAG
<i>pqqL</i>	H1P1_ <i>pqqL</i> _pKD13	attttaatagttcggattttacttaaccgggtaaattcgcccggtttcgcGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>pqqL</i> _pKD13	tagcgaatattgctaaaaatccccgccaacgatgtgttgacggggctgttaATTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>pqqL</i>	ccttggaagacaaatgcgc
	T2_ <i>pqqL</i>	gcaagtgc aaaggactcgtg
<i>ptrA</i>	H1P1_ <i>ptrA</i> _pKD13	gttaacgtgttgaatctggacagaaaaattaagttgattatgaggtccgtgaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>ptrA</i> _pKD13	gtctcggcgacaTCActcattctttcactcatcaggggcattgtttgctATTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>ptrA</i>	ggtgcgtggcgaaggatg
	T2_ <i>ptrA</i>	cacgcagacaggcgatgcgc
<i>puuR</i> (Alexandra Poßling)	H1P1_ <i>puuR</i> _pKD13	tcagcaccatctcgctgaaaaacagcgactctgaccactacagttaaggaaatgcaaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>puuR</i> _pKD13	atgattttgtgtatagattgccggggcgattgcgcttaccgggttacagaacaaaaagaATTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>puuR</i>	ggaacagtagcgagtagcgc
	T2_ <i>puuR</i>	cttacctgagtaagctcatcg
<i>qmcA</i>	H1P1_ <i>qmcA</i> _pKD13	tcaagcagcaattttgtgattatggacgggtacaacaggaggttttcgGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>qmcA</i> _pKD13	gtggatgaacgaccattaactccatcatggctgagtcggtttgtggcgATTCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>qmcA</i>	gccacaaccagaaggaccgg
	T2_ <i>qmcA</i>	ccttgccactcccaaccag
<i>rbsK</i>	H1P1_ <i>rbsK</i> _pKD4	cgtgtaataataagaaaagcagggcacgcgccaccctaacacggtggcgcGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P2_ <i>rbsK</i> _pKD4	gttgaggtagaaacgcccgcaggcgggcaacatctttcattgtagccaaATGAATATCCTCCTTAG
	T1_ <i>rbsK</i>	cggatttgacggtacaccgg
	T2_ <i>rbsK</i>	catccgctgttcacgccttc
<i>rbsR</i>	H1P1_ <i>rbsR</i> _pKD13	taccgtggcgtgaagagatcgacgcatttttagacaggcagaggTGAcgcGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>rbsR</i> _pKD13	gccgaaccggttccatcagaatcgagtagtgaattgtaatcggtgtgctgATTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>rbsR</i>	gatgaagatgcagcgaaggcg
	T2_ <i>rbsR</i>	cacacttgccgatctgaccg
<i>ycbZ</i>	H1P1_ <i>ycbZ</i> _pKD13	ccggttacggtataatcgcggtttgacaacagactaaaaaacatcaactGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>ycbZ</i> _pKD13	tttattgaagcacgcaggatagctaacacgtgtacgctgaacaagtccgaATTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>ycbZ</i>	ccagcgagagcaacacatcgac
	T2_ <i>ycbZ</i>	gaagtaccacccgtttcggtc
<i>yhjJ</i> (Alexandra Poßling)	H1P1_ <i>yhjJ</i> _pKD13	gaccgacaacgggcagttttttattaccaggatagttgatcaggggttcacGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ <i>yhjJ</i> _pKD13	ccagctcatcctaataactgatggtgtgctaactcatcaccatcaggcaATTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ <i>yhjJ</i>	catgttcttcgggtctaacac

	T2_yhjJ	cagcgtaaacgcagcatatgc
yieP	H1P1_yieP_pKD13	cttctgggtggcataactaaggaggaataaaaaagaaaaggaagataagt aGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_yieP_pKD13	tcgccatcgctttggataatcgcatcgacaatcgctgatgcagatccagA TTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_yieP	gtgcataatacgctttccgc
	T2_yieP	gcttaccggaataagcatcgc
ydcI (Alexandra Poßling)	H1P1_ydcI_pKD13	ccgtttgcgccaccttcataactcgtagctgtcgcaacaaggaaactttgg ggcgcgGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_ydcI_pKD13	cagttagtttcgtacggtgtgaaaatgttcaaggaggatcgacagatccc ttcaccttATTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_ydcI	caaacaacttcactgtcagc
	T2_ydcI	gaggcggtggatgtattcc
yjdA (Anja Richter)	H1P1_yjdA_pKD4	ctggctaaataaaataacaaaatttgctttaaggaagaattttGTGTAG GCTGGAGCTGCTT
	H2P2_yjdA_pKD4	ccgactccagcagcgaccggggcgcaagtaacgtcttggtcaaAT GAATATCCTCCTTAG
	T1_yjdA	cttgacagtaattataaaagccgaaaac
	T2_yjdA	gctgctgatgggctgtgg
yjcZ (Anja Richter)	H1P1_yjcZ_pKD13	gcgatgatattcaaacacttttcacggcagaacgatattgaccaagGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_yjcZ_pKD13	cacacatggatttcgtttaggactcattgatgtaactgattatATTCCGGG GATCCGTCGACC
	T1_yjcZ	gtcaacaaaatgaatcggtggtcag
	T2_yjcZ	gttgacgcctgaattgggcag
yjdA-yjcZ	H1P1_yjdA-yjcZ_pKD13	ggctaaataaaataacaaaatttgctttaaggaagaattttctatgtacGTG TAGGCTGGAGCTGCTTC
	H2P4_yjdA-yjcZ_pKD13	gaacgataaaacagcgccagggaacgaccaggcggtatacgcccca ATTCCGGGGATCCGTCGACC
	T1_yjdA	gcaggggcaaaagcgccaaaaaacg
	T2_yjcZ	cgcagagttggccatttccgc

II. Primer zur Herstellung chromosomaler Punktmutationen und Domänendeletionen (vgl. 3.6.6 & 3.6.15). Großbuchstaben entsprechen den P-Sequenzen auf dem Template-Plasmid pKD45.

Chrom. Mutation	Primernamen	Primersequenz (5' → 3')
dgcE::kan/ccdB	H1P1_dgcE_-52_pKD45	gcataaacacagaaacgaataactggcgaccagggtcttgcggataaagcg gtaCGCATCGTGGCCGGATCTTGC
	H2P2_dgcE_3376_pKD45	cgattttagcgatgataagacgcgttagcgatcgatcaggcgatgggga agCGGATAACAGAAAGGCCGGG
TM ^{DgcE} ::kan/ccdB TM ^{DgcEΔEAL} ::kan/ccdB	H1P1_dgcE_-52_pKD45	gcataaacacagaaacgaataactggcgaccagggtcttgcggataaagcg gtaCGCATCGTGGCCGGATCTTGC
	H2P2_dgcE_948_pKD45	cgccataccgatagcggaatattccatcgcttccgaaagtgggttgcgtC GGATAACAGAAAGGCCGGG
GGDEF ^{DgcE} ::kan/ccdB	H1P1_dgcE_2134_pKD45	cagttttgagaacaactgcgtatcctgctgcaaacggttaaagctacaca tcCGCATCGTGGCCGGATCTTGC
	H2P2_dgcE_2536_pKD45	ctgttcatacagcgacatcgccgcccgttcgctatgtgcggcagcttgcgtC GGATAACAGAAAGGCCGGG
dgcE ^{ΔTM} dgcE ^{ΔTMΔEAL}	MP_ΔTM_f	gcataaacacagaaacgaataactggcgaccagggtcttgcggataaagcg gtaatggcggaacgcaaacacatttccg
	MP_ΔTM_r	gccagttcggttgatgtg
dgcE ^{ΔPAS3}	dgcE-d(-377)_f	gccggaagccgatgcgccag
	dgcE-u-3516_r	cgccgttatgccgagcgctgg

	MP_ΔPAS3_f	gtgcggaacgcaaacacatttcgaa agcgctcccatgatgcactg
	MP_ΔPAS3_r	ttcggaatgtgttgcgtccgcac
<i>dgcE</i> ^{ΔEAL}	MP ΔEAL_f	cctggatgttaggaagggggcg
	MP ΔEAL_r	gtaggcataagacgcgttagcgctcatcaggcgatgggaagcac gcctca ccgctcgctatgtgcggcagctg
<i>dgcE</i> ^{GGAFF}	<i>dgcE</i> -d-1665_f	gcgcctgcacattacgctg
	<i>dgcE</i> -u-2275_r	ccggcggtaagagcatggc
	MP_GGAFF_f	gactcgggtgggctgcatttggtctg
	MP_GGAFF_r	cagaccaaagtcagccccaccgagtc
<i>yjdA</i> (bp7-1005)::kan/ccdB	H1P1_ <i>yjdA</i> _ -43_pKD45	ggctaataaaatacaaaaatttgcttaaggaagaattttctatgtacCGC ATCGTGGCCGGATCTTGC
	H2P2_ <i>yjdA</i> _pKD45	ccgttggtgctaactcatagcgcgcccgcgattcgccaggtagccccacatC GGATAACAGAAAGGCCGGG
<i>yjdA</i> T103D	<i>yjdA</i> -d-70_f	gccgaaaacagaactcaaaaac
	<i>yjdA</i> -u-1108_r	cggcatgggcaaatcttc
	MP_ <i>yjdA</i> T103D_f	cgtaatcgcccaatggacgcgctgccgacgcttattc
	MP_ <i>yjdA</i> T103D_r	gaataagcgctggcagcgcgctcattgggcgattacg

III. Primer zur Fusion eines 3xFLAG-tags an den C-Terminus einer chromosomalen Gensequenz (vgl. 3.6.16). Großbuchstaben entsprechen den P-Sequenzen auf dem Template-Plasmid pSUB11. T-Primer dienen als Testprimer zur Überprüfung der erzeugten Fusion.

C-terminal 3xFLAG-markiertes Gen	Primernamen	Primersequenz (5'→3')
<i>dgcE</i> <i>dgcE</i> ^{ΔTM} <i>dgcE</i> ^{ΔMASE1} <i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} (TM1+2) ^{LacY} :: <i>dgcE</i> ^{ΔTM}	H1P1_ <i>dgcE</i> _FLAG	gctggattgctggtgaatagtagttatttcgcgattaacGACTACAAA GACCATGACGG
	H2P2_ <i>dgcE</i> _FLAG	cgcgtagcgtcgcacatcaggcgatgggaagcacgcctcaCCTTAG TTCCTATTCCGAAGTTC
	T1_ <i>dgcE</i> _FLAG	ggatagtgctcagccaggtggg
	T2_ <i>dgcE</i> _FLAG	cgccgttatgccgagcgctgg
<i>dgcE</i> ^{ΔEAL} <i>dgcE</i> ^{ΔTMΔEAL}	H1P1_ <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} _FLAG	gccgggtgacggtttacgaaccgcagcaagctgccgcacatagcgaa cggGACTACAAAGACCATGACGG
	H2P2_ <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} _FLAG	cgcgtagcgtcgcacatcaggcgatgggaagcacgcctcaCCTTAG TTCCTATTCCGAAGTTC
	T1_ <i>dgcE</i> ^{ΔEAL} _FLAG	gattaccttgattgatgacaac
	T2_ <i>dgcE</i> _FLAG	cgccgttatgccgagcgctgg
<i>mlrA</i> (Sandra Lindenberg)	H1P1_ <i>mlrA</i> _FLAG	caccagttggcaagaacaaggccatgatatttccactcggcattGAC TACAAAGACCATGACGG
	H2P2_ <i>mlrA</i> _FLAG	gttaacgaaaggattgtacagtaaagcgcatgttgaacgaatcatta CATATGAATATCCTCCTTAG
	T1_ <i>mlrA</i> _FLAG	caatctacatagcctgcgaacg
	T2_ <i>mlrA</i> _FLAG	ccataaacaggaacagggcg
<i>yjdA</i>	H1P1_ <i>yjdA</i> _FLAG	cccagctgttacgcgatgatattcaaacactttcacggcagaacgatat GACTACAAAGACCATGACGG
	H2P2_ <i>yjdA</i> _FLAG	gataaacgactccagcacgcgaccggggcgtaagtaacgtcttg tcaCCTTAGTTCCTATTCCGAAGTTC
	T1_ <i>yjdA</i> _FLAG_f	cgatctctattgccaacaaatg
	T2_ <i>yjdA</i> _FLAG_r	cttcagcgacaacgggctg

IV. Primer zur Klonierung von Gensequenzen auf pCAB18.

Großbuchstaben entsprechen den Restriktionsschnittstellen.

Plasmidinsert	Primernamen	Primersequenz (5'→3')
<i>dgcE</i> ::6His	<i>dgcE_EcoRI_f</i>	cgcGAATTCatgagcaaacaatcacagc
<i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} ::6His (Template: VP180)	<i>dgcE-6His_HindIII_r</i>	gacAAGCTTtcagtgtggtgatggtgatggttaatcgcgaaataactac
<i>dgcE</i> ^{GGAAF} ::6His (Template: VP336)	<i>dgcE-6His_HindIII_r</i>	gacAAGCTTtcagtgtggtgatggtgatggttaatcgcgaaataactac
<i>dgcE</i> ^{ΔTM} ::6His	<i>dgcEΔTM_EcoRI_f</i>	cgcGAATTCatgagcaaagcgaacgcaaacacatttcc
	<i>dgcE-6His_HindIII_r</i>	gacAAGCTTtcagtgtggtgatggtgatggttaatcgcgaaataactac
<i>dgcE</i> ^{ΔMASE1} ::6His	<i>dgcEΔMASE1_EcoRI_f</i>	cgcGAATTCatgagcaaagcgtctgccacgaatggaagcc
	<i>dgcE-6His_HindIII_r</i>	gacAAGCTTtcagtgtggtgatggtgatggttaatcgcgaaataactac
<i>dgcE</i> ^{ΔEAL} ::6His	<i>dgcE_EcoRI_f</i>	cgcGAATTCatgagcaaacaatcacagc
	<i>dgcEΔEAL-6His_HindIII_r</i>	gacAAGCTTtcagtgtggtgatggtgatgccgttcgctatgtgcggcag
<i>dgcE</i>	<i>dgcE_EcoRI_f</i>	cgcGAATTCatgagcaaacaatcacagc
	<i>dgcE-EAL_HindIII_r</i>	gacAAGCTTtcagttaatcgcgaaataactac
<i>EAL</i> ^{<i>dgcE</i>} ::6His	<i>dgcE-EAL_EcoRI_f</i>	cgcGAATTCatggctgccgcacatagcgaacg
	<i>dgcE-EAL_His_HindIII_r</i>	gacAAGCTTtcagtgtggtgatggtgatG gttaatcgcgaaataactac
<i>yjdA-yjcZ</i>	<i>yjdA_yjcZ_EcoRI_f</i>	cgcGAATTCatgtacacacagaccctgtatg
	<i>yjdA_yjcZ_HindIII_r</i>	gacAAGCTTttacgcaaattacagagaag
<i>yjdAT103D-yjcZ</i>	<i>MP_yjdA_T103D_f</i>	cgtaatcgcccaatgGACGcgctgccgacgcttattc
	<i>MP_yjdA_T103D_r</i>	gaataagcgctggcagcgcGTCcattggcgattacg

V. Primer zur Klonierung von Gensequenzen auf BTH-Plasmide (vgl. 3.7.5).

Großbuchstaben entsprechen den Restriktionsschnittstellen.

Plasmidinsert	Primernamen	Primersequenz (5'→3')
<i>dgcE</i>	<i>BTH_dgcE_XbaI_f</i>	gccTCTAGAgagcaaacaatcacagcatg
<i>dgcE</i> ^{ΔPAS3} (Template:VP180)	<i>BTH_dgcE_KpnI_r</i>	gccGGTACCcggttaatcgcgaaataactac
<i>dgcE</i> ^{ΔTM}	<i>BTH_dgcE_wo_TM_XbaI_f</i>	gccTCTAGAgcgtgcggaacgcaaacacatttccg
	<i>BTH_dgcE_KpnI_r</i>	gccGGTACCcggttaatcgcgaaataactac
<i>dgcE</i> ^{ΔGGDEF}	<i>BTH_dgcE_XbaI_f</i>	gccTCTAGAgagcaaacaatcacagcatg
	<i>BTH_dgcE_KpnI_r</i>	gccGGTACCcggttaatcgcgaaataactac
	<i>BTH_MP_ΔGGDEF_f</i>	gtatcctgtcgaaacggttaacagtacacatcagcaagctgccgcac atagc
	<i>BTH_MP_ΔGGDEF_r</i>	atgtgtactgtttaccgtttgcagcaggatac
<i>dgcE</i> ^{ΔEAL}	<i>BTH_dgcE_XbaI_f</i>	gccTCTAGAgagcaaacaatcacagcatg
	<i>BTH_dgcE_wo_EAL_KpnI_r</i>	gccGGTACCcgccgttcgctatgtgcggcagcttg
<i>TM</i> ^{<i>DgcE</i>}	<i>BTH_dgcE_XbaI_f</i>	gccTCTAGAgagcaaacaatcacagcatg
	<i>BTH_dgcE_TM_KpnI_r</i>	gccGGTACCcggttcggaatgtgtttgcgtt
<i>PAS3</i> ^{<i>DgcE</i>}	<i>BTH_dgcE-PAS3_XbaI_f</i>	gccTCTAGAgcacatttccgaaagcgaaacc
	<i>BTH_dgcE-PAS3_KpnI_r</i>	gccGGTACCcgcgattgtttctaaaactggc
<i>GGDEF</i> ^{<i>DgcE</i>}	<i>BTH_dgcE-GGDEF_XbaI_f</i>	gccTCTAGAgagtacacatcagcgacatgcc
	<i>BTH_dgcE-GGDEF_KpnI_r</i>	gccGGTACCcgagcttgctgcggttcgtaaac
<i>EAL</i> ^{<i>DgcE</i>}	<i>BTH_dgcE_EAL_XbaI_f</i>	gccTCTAGAggcacatagcgaacgggcggc
	<i>BTH_dgcE_KpnI_r</i>	gccGGTACCcggttaatcgcgaaataactac

<i>TM-PAS3^{DgcE}</i>	BTH_ <i>dgcE</i> _XbaI_f	gccTCTAGAgagcaaacaatcacagcatg
	BTH_ <i>dgcE</i> -PAS3_KpnI_r	gccGGTACCcgagctgtttctcaaaactggc
<i>PAS3-GGDEF^{DgcE}</i>	BTH_ <i>dgcE</i> -PAS3_XbaI_f	gccTCTAGAgcacatttccgaaagcgaaacc
	BTH_ <i>dgcE</i> -GGDEF_KpnI_r	gccGGTACCcgagctgtgtcggttcgtaaacc
<i>GGDEF-EAL^{DgcE}</i>	BTH_ <i>dgcE</i> Δ <i>TM-PAS3</i> _XbaI_f	gccTCTAGAgagcgccctcccatgatgcactg
	BTH_ <i>dgcE</i> _KpnI_r	gccGGTACCcggttaacgcgaaataactac
<i>motA</i>	BTH_ <i>motA</i> _XbaI_f	gccTCTAGAgcttatcttattaggttacctg
	BTH_ <i>motA</i> _KpnI_r	gccGGTACCcggtgcttctcggtgtcgctg
<i>pdeR</i>	BTH_ <i>pdeR</i> _XbaI_f	gccTCTAGAgaaaaccggttagggagtcac
	BTH_ <i>pdeR</i> _BamHI_r	gccGGATCCcggtgcgcgcttcagatagcggt
<i>yjcZ</i>	BTH_ <i>yjcZ</i> _XbaI_f	gccTCTAGAgaccaagacgttacttgacggc
	BTH_ <i>yjcZ</i> _KpnI_r	gccGGTACCcgcgccaaatttacagagaaga
<i>yjdA</i>	BTH_ <i>yjdA</i> _XbaI_f	gccTCTAGAgtagacacagaccctgtatgag
	BTH_ <i>yjdA</i> _BamHI_r	gccGGATCCcgatatcggttgcggtgaaaag

VI. Sonstige Primer.

Primernamen	Primersequenz (5'→3')	Verwendung
k1	cagtcataagccgaatagcct	Interne Testprimer der <i>kan</i> - bzw. <i>kan/ccdB</i> -Kassetten (von pKD4, pKD13, pKD45)
k2	cggtgccctgaatgaactgc	
cm1	ttatacgcaaggcgacaagg	Interne Testprimer der <i>cm</i> -Kassette (von pKD3)
cm2	gatcttccgtcacaggtagg	
pTI2-1-1	ggcaaataattctgaaatgagc	Testprimer für Insert-PCR auf pCAB18
pTI2-1-2	gcgtttcacttctgagttcg	
pKT25-1	gatttcgaggcggtaagggtg	Testprimer für Insert-PCR auf pKT25
pKT25-2	gacgttgtaaaacgacggcc	
pKNT25-1	ccggctcgatgtgtgtgg	Testprimer für Insert-PCR auf pKNT25
pKNT25-2	ggccatgcgccaggctgctg	
pUT18-1	cacacaggaaacagctatg	Testprimer für Insert-PCR auf pUT18
pUT18-2	gcgcgagcgatttccac	
pUT18C-1	cgcagtgaacgccactgc	Testprimer für Insert-PCR auf pUT18C
pUT18C-2	ctgtaagcggatgccggg	

Für die Herstellung der chromosomalen Mutationen *dgcE*^{ΔMASE1} und *(TM1+2)^{LacY}::dgcE*^{ΔTM} wurden in Tab. 7 aufgelistete synthetisch hergestellte DNA-Fragmente (GeneArt life technologies) direkt für homologe Rekombinationen in VP187, VP207 und VP208 eingesetzt.

Tab. 7: Synthetisch hergestellte DNA-Fragmente.

Verwendung	Sequenz (5'→3')
<i>dgcE</i> ^{ΔMASE1}	gcataaacacagaaacgaataactggcgaccaggtcttgcgataaagcggtatATGagcaaacgtctgcc acgaatggaagccttttgatcttctaccacgggtgatggtgtcgctgatgatggccgcgatccctccctg cttgctacgcgcgtacgtacgtgatgagccatagccgtggctaccggttttgcgtgatctgtgcccgcaca tcatgacctggtgatgtatgccttctgctggaacgaaacacatttccgaaagcgaaacccacttccggaac cgatggaatattccgctatcggtatggcg
<i>(TM1+2)^{LacY}::dgcE</i> ^{ΔTM}	gcataaacacagaaacgaataactggcgaccaggtcttgcgataaagcggtatATGtactattaaaaaac acaaacttttgatgttcggtttattcttttttattctttttatcatgggagcctacttccggttttcccgatttgctaca tgacatcaaccatacagcaaaagtatacgggtatttttgcgctatttctgttctcgctattattccaaccg ctgtttgctgcttctgcggaacgaaacacatttccgaaagcgaaacccacttccggaacgcgatggaatat tccgctatcggtatggcg

3.6.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde für vielfältige Zwecke genutzt. Sie diente der Amplifizierung von DNA-Fragmenten, ermöglichte aber auch das Anheften von Restriktionsschnittstellen an Gene, die somit im späteren Verlauf auf Vektoren kloniert werden konnten (vgl. 3.6.9 - 3.6.13). Zudem konnten mithilfe der PCR diverse chromosomale Mutationen generiert werden (vgl. 3.6.6, 3.6.14 - 3.6.16). Test-PCRs wurden standardmäßig mit der *Opti*Taq DNA Polymerase (Roboklon) durchgeführt. Für die Generierung von DNA-Fragmenten, die der Klonierung oder homologen Rekombination dienten, wurde die Q5-High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) verwendet. Die Elongationszeit richtete sich nach den erwarteten DNA-Fragmentgrößen und die Annealingtemperatur wurde 2-5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur festgelegt. Die Reaktionen wurden in 50 µl-Ansätzen hergestellt:

Opti*Taq* Polymerase:

10x Puffer C	5 µl
dNTP [25 mM]	0,5 µl
Forwardprimer [10 µM]	1 µl
Reversprimer [10 µM]	1 µl
Opti <i>Taq</i> [2,5 U/µl]	0,3 µl
DNA	variabel *
ddH ₂ O	ad 50 µl

Q5 Polymerase:

5x Q5-Puffer	10 µl
dNTP [25 mM]	0,4 µl
Forwardprimer [100 µM]	0,25 µl
Reversprimer [100 µM]	0,25 µl
Q5 Polymerase [2 U/µl]	0,5 µl
DNA	variabel *
ddH ₂ O	ad 50 µl

* Als DNA-Template wurden entweder 1-5 µl Plasmid-DNA verwendet oder 10 µl einer Bakterienkoloniesuspension.

3.6.6 Punktspezifische Mutagenese mittels Zwei-Schritt PCR

Für zielgerichtete Mutationen in Form von Punktmutationen wurde das Prinzip einer zweistufigen PCR angewendet, wobei vier Primer (vgl. Tab. 6) benötigt wurden. Zwei dieser Primer binden extern (ext) – stromauf- (GenX_f) bzw. stromabwärts (GenX_r) – des zu mutierenden DNA-Bereiches, zwei weitere Primer beinhalten die einzubringende Mutationssequenz (Mutationsprimer = MP) und sind komplementär zueinander (MP_GenX_f und MP_GenX_r). Im ersten PCR-Schritt wurde genomische DNA mit jeweils einem extern bindenden Primer und einem Mutationsprimer amplifiziert (GenX_f/MP_GenX_r & MP_GenX_f/GenX_r), sodass zwei einander partiell überlappende PCR-Produkte entstanden, die separat mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion gereinigt wurden (vgl. 3.6.7 - 3.6.8). Im zweiten Schritt wurden beide PCR-Produkte im Verhältnis 1:1 für eine weitere PCR-Reaktion eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit den beiden extern der Mutationsregion bindenden Primern (GenX_f/GenX_r), wodurch schließlich ein DNA-Fragment entstand, welches für die gewünschte Mutation kodiert und

nach Reinigung für Klonierungen bzw. Transformationen verwendet werden konnte. Sollten die PCR-Fragmente für Klonierungen eingesetzt werden, wurden die extern bindenden Primer zusätzlich mit geeigneten Restriktionsschnittstellen versehen.

Für die Deletion einzelner Domänen innerhalb eines Proteins mussten die MP-Primer anders konstruiert werden. Ein Primer bindet direkt stromaufwärts der zu deletierenden Domänensequenz (MP_ΔDomäneX_r) und konnte als Reversprimer mit dem externen stromaufwärts lesenden Primer (GenX_f) kombiniert werden. Der zweite MP-Primer (MP_ΔDomäneX_f) beinhaltet eine zum MP_ΔDomäneX_r-Primer komplementäre Sequenz, an deren 3'-Ende eine ca. 20 nt umfassende DNA-Sequenz fusioniert ist, die direkt stromabwärts der zu deletierenden Domäne bindet. Durch Kombination dieses MP-Primers mit einem externen stromabwärts lesenden Primer (GenX_r) entsteht ein PCR-Fragment, welches DNA-Sequenzen unmittelbar stromauf- und stromabwärts der zu deletierenden Domäne trägt. Im zweiten Schritt (siehe oben) wird dadurch ein finales DNA-Fragment erzeugt, das die gewünschte Deletion trägt.

3.6.7 Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihres Molekulargewichts wurden die PCR-Produkte mit DNA-Gelladepuffer versetzt und zusammen mit einem DNA-Längenstandard (100 bp-DNA-Leiter extended, Carl Roth) auf ein 1-2 %iges Agarosegel (in 1x TAE) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 90-120 V für ca. 45 min. Nachdem das Agarosegel für 20 min in einer GelRed-Lösung (Genaxxon, 1:1000 in H₂O) inkubiert worden ist, fand die DNA-Detektion unter UV-Licht statt.

DNA-Gelladepuffer (6x)

Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
Glycerin	30 %
in 1x TAE	

TAE-Stammlösung (50x)

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M)	100 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

3.6.8 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder dem Monarch[®] DNA Gel Extraction Kit (NEB) nach Angaben der Hersteller.

3.6.9 Restriktionsverdau

Für den Verdau von PCR-Fragmenten und Vektoren, die spezifische Restriktionsschnittstellen aufwiesen, wurden entsprechende Restriktionsenzyme (NEB) gemäß den Herstellerangaben verwendet, wobei die Inkubation in der Regel für 30 min bei 37°C erfolgte. Bei dem Verdau von Vektoren wurde der Ansatz anschließend mit 1 µl CIP (NEB) versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert, um mittels Dephosphorylierung der freien 5'-Enden eine Religation des Vektors zu minimieren. Abschließend wurden sämtliche Restriktionsansätze mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) oder dem Monarch® PCR&DNA Cleanup Kit (NEB) nach Angaben der Hersteller gereinigt. Ein Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

40 µl-Ansatz für PCR-Produkte:

PCR-Produkt	30 µl
10x Puffer	4 µl
Restriktionsenzym 1 [20 U/µl]	1 µl
Restriktionsenzym 2 [20 U/µl]	1 µl
ddH ₂ O	4 µl

20 µl-Ansatz für Plasmide:

Plasmid-DNA	5 µl
10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym 1 [20 U/µl]	0,5 µl
Restriktionsenzym 2 [20 U/µl]	0,5 µl
ddH ₂ O	12 µl

3.6.10 Ligation

Die Ligation von Plasmiden und PCR-Produkten, die mit gleichen Restriktionsenzymen verdaut worden sind (vgl. 3.6.9), erfolgte mittels der T4 DNA Ligase (NEB). Der Ligationsansatz wurde in einem Thermocycler (140 Zyklen mit alternierend 10°C und 30°C für jeweils 30 sek) inkubiert und setzte sich wie folgt zusammen:

verdautes PCR-Produkt	11,5 µl
verdautes Plasmid	1 µl
10x T4-Puffer	1,5 µl
T4 DNA Ligase [400 U /µl]	1 µl

3.6.11 TSS-Transformation

Für die Übertragung von gereinigten Plasmiden in einen Rezipienten-Stamm wurde eine TSS-Transformation durchgeführt (Chung et al., 1989). Ein zu transformierender Bakterienstamm wurde in 2-3 ml LB-Medium angeimpft und für ca. 2 h bei 37°C inkubiert (exponentielle Wachstumsphase). Anschließend wurden 200 µl Bakterienkultur mit 200 µl eiskaltem sterilem 2x TSS-Medium (in LB-Medium: 20 % PEG-6000, 10 % DMSO, 10 mM Mg₂SO₄) und 1 µl Plasmid-DNA gemischt. Nach 30-minütiger Inkubationszeit auf Eis wurden die Ansätze für 1 h bei 37°C bzw. 28°C (bei temperatursensitiven Plasmiden) im

Thermomixer geschüttelt und auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte im Brutschrank bei 28°C bzw. 37°C über Nacht. Für Plasmidanreicherungen wurde zumeist der *E. coli* Stamm XL-1 Blue als Rezipient verwendet, da aufgrund seiner verminderten Rekombinaseaktivität eine erhöhte Insert-Stabilität gegeben ist.

3.6.12 Herstellung elektrokompetenter *Escherichia coli* Zellen

Zunächst wurde LB-Medium mit einer Übernachtskultur eines Bakterienstammes inokuliert (1 ml Bakterienkultur pro 100 ml LB-Medium) und bis zu einer $OD_{578} = 0,5 - 0,7$ unter Schütteln inkubiert. Die Anzucht der Bakterienkultur erfolgte bei 37°C (z. B. XL-1 Blue für Klonierungen, W3110 $\Delta cyaA$ für BTH-Assays). Wurden Stämme bearbeitet, die der Generierung von Deletionsmutanten dienen (Datsenko and Wanner, 2000), mussten diese zunächst mittels TSS-Transformation (vgl. 3.6.11) mit pKD46 (Amp^R) transformiert werden. Da es sich hierbei um ein Plasmid mit hitzesensitivem *ori* handelt, erfolgte die Bakterienanzucht hier in LB/Amp¹⁰⁰-Medium bei 28°C. Die Plasmidexpression (λ -Red-Rekombinase-System) wurde ab einer $OD_{578} = 0,5 - 0,7$ mit einer Endkonzentration von 10 mM Arabinose für 30 min induziert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden für sämtliche Stämme durchgeführt. Die angewachsene Kultur wurde für 30 min auf Eis gestellt und anschließend für 15 min bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschritte des Pellets, zunächst in 1/2 Kulturvolumen sterilem eiskaltem ddH₂O, dann in 1/50 Kulturvolumen sterilem eiskaltem 10 % Glycerin (Zentrifugationen bei 6000 rpm und 4°C). Schließlich wurde das Pellet in 1/500 Kulturvolumen sterilem eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert, das Gemisch in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.6.13 Elektrotransformation

Es wurden 50 μ l elektrokompetenter Zellen (vgl. 3.6.12) auf Eis aufgetaut, mit 1 - 5 μ l Plasmid-DNA (bei Klonierungen und BTH-Assays) bzw. PCR-Produkt (bei homologen Rekombinationen) versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Biozym) überführt. Die folgende Elektroporation erfolgte mit 2500 V, 25 μ F und 200 Ω für etwa 3 - 5 sek. Anschließend wurde der Ansatz in 500 μ l SOC-Medium aufgenommen, bei 37°C bzw. 28°C für 1 h geschüttelt und auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte über Nacht bei 37°C bzw. 28°C im Brutschrank.

3.6.14 Erzeugung chromosomaler Gendeletionen mittels Ein-Schritt-Inaktivierung

Die Inaktivierung einzelner Gene oder kompletter Operons beruhte auf dem Prinzip der homologen Rekombination, durch die der Austausch einer entsprechenden chromosomalen Region mit einer PCR-amplifizierten Kanamycin- oder Chloramphenicol-Resistenzkassette ermöglicht wurde (Datsenko and Wanner, 2000). Als DNA-Matrize für die Amplifikation der Antibiotika-Resistenzkassette dienten die Plasmide pKD3 (Cm^R), pKD4 (Kan^R) und pKD13 (Kan^R). Die verwendeten Primer (vgl. Tab. 6) weisen am 5'-Ende eine ca. 50 bp umfassende Sequenz auf, die homolog zu der stromauf- bzw. stromabwärts liegenden DNA-Sequenz des zu inaktivierenden DNA-Bereichs ist (H1 und H2). Das 3'-Ende entspricht einer ca. 20 bp langen Sequenz, die für das Binden an eines der oben beschriebenen Plasmide vonnöten ist (P1 und P2). Das resultierende PCR-Produkt (Antibiotika-Resistenzkassette flankiert von H1- und H2-Sequenzen) wurde gereinigt (vgl. 3.6.8) und durch Elektroporation in elektrokompente *E. coli* Zellen eingebracht, die das Plasmid pKD46 trugen und somit das für homologe Rekombination notwendige λ -Red-Rekombinase-System exprimierten (vgl. 3.6.12 - 3.6.13). Die Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten bei 37°C erlaubte die Anreicherung von Transformanten, die die Antibiotika-Resistenzkassette stabil ins Chromosom integriert und das temperatursensitive pKD46-Plasmid verloren haben. Nach einem selektiven Reinigungsausschuss wurden die Klone mittels einer Test-PCR auf korrekte Insertion hin geprüft (Primer: T1, T2, k1, k2, cm1, cm2). Um das Auftreten sekundärer durch das λ -Red-Rekombinase-System vermittelter Mutationen zu minimieren, wurde ein positiv getesteter Klon zur Herstellung eines P1-Lysates verwendet, wodurch die erzeugte Mutation mittels P1-Transduktion in verschiedenste Stammhintergründe eingebracht werden konnte (vgl. 3.5.5 - 3.5.6). Die Antibiotika-Resistenzkassette konnte bei Bedarf mithilfe einer FLP-Rekombinase, die vom Helferplasmids pCP20 exprimiert wurde, entfernt werden. Dabei blieb eine „Narbe“ von ca. 80 bp im Chromosom zurück (Datsenko and Wanner, 2000).

3.6.15 Erzeugung von chromosomalen Punktmutationen und Deletionen einzelner Proteindomänen mittels Zwei-Schritt-Inaktivierung

Für zielgerichtete chromosomale Mutationen in Form von Punktmutationen und der Deletion einzelner Domänen innerhalb eines Proteins wurde von einer modifizierten Methode der in 3.6.14 erläuterten Ein-Schritt-Inaktivierung (Datsenko and Wanner, 2000) Gebrauch gemacht. Die für die PCR-Reaktion verwendeten HP-Primer (vgl. Tab. 6) wurden hierbei ähnlich konstruiert, wobei die H-Sequenzen stromauf- bzw. stromabwärts der zu

mutierenden DNA-Region binden und die P-Sequenzen komplementär zum Plasmid pKD45 sind, welches für eine Kanamycin-Resistenzkassette und ein Rhamnose-induzierbares CcdB-Toxin kodiert. Nach der Elektroporation des gereinigten PCR-Fragments in elektrokompente *E. coli* Zellen, die das induzierte λ -Red-Rekombinase-System trugen (vgl. 3.6.12 - 3.6.13), erfolgte die Selektion auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten. Zusätzlich wurden die Transformanten durch Ausstriche auf M9-Rhamnoseplatten auf Rhamnosesensitivität getestet und die korrekte Insertion der *kan/ccdB*-Kassette per PCR geprüft. Nach anschließender P1-Transduktion (vgl. 3.5.6) der Kassette in einen frischen *E. coli* Stammhintergrund wurde dieser mit pKD46 transformiert, unter Arabinose-vermittelter Induktion des Plasmids elektrokompent gemacht und für eine weitere Elektroporation herangezogen, wobei das eingebrachte DNA-Fragment die gewünschte Mutation bzw. Deletion aufwies (vgl. 3.6.6, Tab. 7). Erfolgreich transformierten Zellen war durch den Verlust der *kan/ccdB*-Kassette das Wachstum auf Rhamnose möglich, sodass die Selektion auf M9-Rhamnoseplatten erfolgte. Zusätzlich wurden die Transformanten auf den Verlust der Kanamycinresistenz hin getestet und mittels Test-PCR überprüft.

3.6.16 Erzeugung chromosomaler 3xFLAG-Fusionen

Um chromosomal exprimierte Proteine mittels Immunoblotanalyse (vgl. 3.7.4) detektieren zu können, wurde ein 3xFLAG-Tag-Peptid an den C-Terminus des entsprechenden Proteins fusioniert. Zu diesem Zweck wurde von einer modifizierten Methode der in 3.6.14 erläuterten Ein-Schritt-Inaktivierung (Datsenko and Wanner, 2000) Gebrauch gemacht. Das Plasmid pSUB11 diente als DNA-Matrize, wodurch in einer PCR-Reaktion (Primer vgl. Tab. 6) ein Fragment generiert wurde, welches für einen 3xFLAG-Tag sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette kodiert und von homologen Sequenzen flankiert ist (H1 und H2: chromosomale Bereiche stromauf- und stromabwärts der Insertionsregion) (Uzzau et al., 2001). Der weitere Verlauf ist in 3.6.14 erläutert. Durch chromosomale Kreuzung entstand somit ein Stamm, der an einer proteinkodierenden Sequenz X eine im offenen Leserahmen befindliche C-terminale 3xFLAG-Tag-Sequenz aufwies und stromabwärts zudem für eine Antibiotika-Resistenzkassette zu Selektionszwecken kodiert (*GenX::3xFLAG::kan*). Die Antibiotika-Resistenzkassette wurde mithilfe einer FLP-Rekombinase, die vom Helferplasmid pCP20 exprimiert wurde, entfernt. Dabei blieb eine „Narbe“ von ca. 80 bp im Chromosom zurück (Datsenko and Wanner, 2000).

3.6.17 Sequenzierungen

Um sicherzustellen, dass neu generierte Plasmide und hergestellte chromosomale Mutationen die korrekten Nukleotidsequenzen aufweisen, wurden die entsprechenden Plasmide bzw. DNA-Fragmente bei der Firma GATC Biotech zur Sequenzierung in Auftrag gegeben und anschließend analysiert.

3.7 Protein-basierte Methoden

3.7.1 Proteinextraktion aus Bakterienzellen

Für die Extraktion von Proteinproben aus flüssigen Bakterienkulturen wurde zu bestimmten OD₅₇₈-Werten ein Kulturvolumen entnommen, welches 60 – 120 µg Gesamtzellprotein entsprach. Dabei wurde davon ausgegangen, dass 1 ml Kultur bei einer OD₅₇₈ = 1 107 µg Gesamtprotein entspricht. Das entnommene Kulturvolumen wurde für 10 min bei 13000 rpm pelletiert, das Pellet wurde in 1x SDS-Ladepuffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Für die Probenentnahme aus 1 d und 2 d alten Makrokolonien wurden diese zunächst in 1x Z-Puffer (Rezept vgl. 3.9.1) vollständig resuspendiert. Von der resultierenden Zellsuspension wurde die OD₅₇₈ bestimmt und anschließend ein geeignetes Volumen entnommen, welches wie oben beschrieben behandelt wurde.

SDS-Ladepuffer (1x)

Tris pH 6,8	60 mM
SDS	2 %
Glycerin	10 %
Bromphenolblau	0,005 %

3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts in einer Polyacrylamidmatrix erfolgte nach Standardangaben (Laemmli, 1970). Mit SDS-Ladepuffer versetzte Proteinproben (vgl. 3.7.1) wurden zunächst für 10 min bei 70°C und für 15 min bei 100°C gekocht und dann zusammen mit einem geeigneten Protein-Längenstandard (WesternSure® Pre-stained Chemiluminescent Protein Ladder, LI-COR & Color Plus Prestained Protein Marker, Biolabs) auf ein 10 - 12 %iges Polyacrylamidgel (vgl. Tab. 8) aufgetragen. Die anschließende SDS-Gelelektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 25 mA pro Gel (5 x 10 cm) für 40 – 60 min.

Tab. 8: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen für die SDS-PAGE.

	Sammelgel	Trenngel	
Acrylamidgehalt	4 %	10 %	12 %
ddH ₂ O	3,05 ml	4,06 ml	3,39 ml
Sammelgel-Puffer	1,25 ml	-	-
Trenngel-Puffer	-	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30)	0,65 ml	3,33 ml	4 ml
10 % APS	50 µl	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl

SDS-Sammelgelpuffer, pH 6,8

Tris 0,06 g
 SDS 0,8 g
 ddH₂O ad 100 ml

SDS-Trenngelpuffer, pH 8,8

Tris 36,34 g
 SDS 0,8 g
 ddH₂O ad 200 ml

SDS-Laufpuffer

Tris-HCl 25 mM
 Glycerin 0,19 M
 SDS 0,1 %

3.7.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Für die unspezifische Anfärbung von mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen (vgl. 3.7.2) wurde das SDS-Gel in einer Coomassie-Färbelösung kurz aufgeköcht und unter Schütteln ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sichtbarmachung einzelner Proteinbanden erfolgte durch Entfärbung des Gels in 10 %iger Essigsäure unter kontinuierlichem Schütteln.

Coomassie-Färbelösung

Isopropanol 25 %
 Essigsäure 10 %
 Coomassie Brilliant Blue G 0,1 %

3.7.4 Immunoblotanalyse (Westernblot)

Die gezielte Detektion einzelner Proteine erfolgte mithilfe von spezifischen Antikörpern. Hierzu wurden Proteine nach ihrer Auftrennung durch SDS-PAGE (vgl. 3.7.2) auf eine PVDF-Membran (Roth), die zuvor in Methanol und Transblotpuffer äquilibriert wurde, übertragen. Zwischen zwei Whatman-Papieren (Roth) wurden das SDS-Gel und die Membran luftblasenfrei übereinandergelegt und in einer mit eiskaltem Transblotpuffer gefüllten Blotting-Apparatur für 1 h bei 100 V geblottet („wet blot“). Danach wurde die Membran in TBSTM über Nacht bei 4°C geschüttelt, um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren. Die Membran wurde daraufhin bei Raumtemperatur unter Schütteln für 2 h mit

einem primären Antikörper inkubiert, drei Mal mit TBST für jeweils 5 min gewaschen und für 1 h mit einem sekundären HRP(*horseradish peroxidase*)-konjugierten Antikörper inkubiert. Nach vier 10-minütigen Waschschritten in TBST wurde die Membran für 5 min lichtgeschützt in einem Chemilumineszenz-Reagenz (Clarity™ Western ECL Substrate, Biorad) inkubiert, was aufgrund von HRP-vermittelter Oxidation von Luminol in der Emission von Licht resultiert. Die Detektion der Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte schließlich mit einer CCD-Kamera (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare). Sämtliche Antikörper wurden in TBSTM verdünnt. Für die Detektion von CsgD und RpoS wurden aus Kaninchenserum gewonnene polyklonale Antikörper (1:10000) und ein anti-rabbit-HRP-Antikörper (1:20000, GE Healthcare) verwendet. Chromosomal 3xFLAG-markierte Proteine wurden mithilfe der Antikörper anti-3xFLAG (aus Maus, 1:10000, Sigma-Aldrich) und anti-mouse-HRP-Antikörper (1:40000, Thermo Scientific) sichtbar gemacht. Plasmidkodierte 6His-markierte Proteine wurden mit den Antikörpern anti-6His (aus Kaninchen, 1:10000, Bethyl Laboratories) und anti-rabbit-HRP (1:20000, GE Healthcare) detektiert.

Transblottpuffer		TBST		TBSTM
Tris (pH 7,5)	25 mM	Tris (pH 7,5)	20 mM	Milchpulver 5 %
Glycerin	192 mM	NaCl	150 mM	in TBST
Ethanol	20 %	Tween-20	0,05 %	

3.7.5 Protein-Interaktionsstudien (Bacterial-Two-Hybrid-Assay)

Interaktionen von Proteinen bzw. einzelnen Proteindomänen *in vivo* wurden mithilfe eines Bacterial-Two-Hybrid(BTH)-Assays nach Karimova et al. (Karimova et al., 1998) untersucht (vertrieben von EUROMEDEX). Diese Methode basiert auf der interaktionsvermittelten Wiederherstellung der Adenylatzyklase(CyaA)-Aktivität in Bakterien und ermöglicht somit die cAMP-abhängige Verstoffwechselung alternativer Kohlenstoffquellen. Um den BTH-Assay durchführen zu können, wurde die Sequenz eines proteinkodierenden Gens auf vier unterschiedliche Plasmide kloniert (Primer vgl. Tab. 6), die für die CyaA-Untereinheiten T18 bzw. T25 aus *Bordetella pertussis* kodieren. Somit wurden letztlich von Plasmiden exprimierte Fusionsproteine generiert, bei denen die T18- bzw. T25-Einheit an den C-(pKNT25, pUT18) bzw. N-Terminus (pKT25, pUT18C) des zu testenden Proteins gekoppelt wurde. Die Co-Transformation eines T18- und eines T25-kodierenden Plasmids (inkl. Insert) erfolgte mittels Elektroporation in *E. coli* K12 W3110 $\Delta cyaA$ Zellen (vgl. 3.6.12 - 3.6.13) mit anschließender Selektion auf MacConkey-Platten (vgl. 3.3.2) für 1 - 2 d bei 28°C. Sofern die getesteten Fusionsproteine miteinander interagierten, wurde dies durch Rotfärbung der Transformanten sichtbar. Diese beruhte darauf, dass durch die interaktionsvermittelte

räumliche Nähe der T18- und T25-Einheiten cAMP produziert wurde, an den Transkriptionsregulator CRP binden konnte und folglich den fermentativen Abbau von alternativen Kohlenstoffquellen (z. B. Maltose und Laktose) ermöglichte. Die resultierende Ansäuerung der Umgebung wurde letztlich durch den Farbumschlag des im Medium vorhandenen pH-Indikators Neutralrot sichtbar. Transformanten, in denen keine derartige Proteininteraktion stattfand, resultierten in weißen Kolonien. Anschließend wurden die Transformanten in 50 µl ddH₂O resuspendiert und 5 µl davon wurden auf eine neue MacConkey-Platte getropft. Nach erneuter Inkubation bei 28°C für 1 – 2 d erfolgte die Auswertung der Ergebnisse. Die Positivkontrolle bestand aus der Co-Transformation von pKT25-*zip* und pUT18C-*zip*, da die an die T18- bzw. T25-Einheit fusionierten Leucin-Zipper eine sehr starke Dimerisierung zur Folge haben. Als Negativkontrollen dienten Ansätze, bei denen ein Plasmid mit Insert (= Fusionsprotein) und ein Plasmid ohne Insert co-transformiert wurden.

3.8 RNA-basierte Methoden

3.8.1 RNA-Extraktion aus Bakterienzellen

Für die Extraktion zellulärer Gesamt-RNA wurden 25 ml LB-Medium mit einer bei 37°C angewachsenen Übernachtskultur auf eine OD₅₇₈ = 0,05 angeimpft und bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₅₇₈ = 3,5 – 4 wurden 1,5 ml Kulturvolumen entnommen, mit 300 µl einer 5 %igen Phenollösung (in Ethanol) gemischt und bei 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Extraktion der RNA wurde mithilfe des SV Total RNA Isolation Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mittels Nanodrop bestimmt (vgl. 3.6.3).

3.8.2 Northernblotanalyse

4 µg an isolierter Gesamt-RNA (vgl. 3.8.1) wurden mit Ambion Loading Dye II (Ambion) versetzt und auf ein 6 %iges Polyacrylamidgel, versetzt mit 7 M Urea [6 % Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 40) & 7 M Urea in 1x TBE], aufgetragen. Die anschließende Gelelektrophorese erfolgte in TBE bei 20 mA. Nach der Auftrennung wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roth) übertragen. Dazu wurden zwischen zwei Whatman-Papieren (Roth) das Gel und die Membran luftblasenfrei übereinandergelegt und in einer mit eiskaltem 1x TBE gefüllten Blotting-Apparatur für 1 h bei 20 V geblottet. Die Membran wurde

daraufhin zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet, die RNA mittels UV-Crosslinking für 5 min auf der Membran fixiert und die Membran luftblasenfrei in ein Röhrchen (zu Hybridisierungszwecken) überführt. Es folgte die Prähybridisierung der Membran in 10 ml DIG Easy Hyb Buffer (Roche) für 1 h bei 47°C im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation. Für die anschließende Hybridisierung wurden Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonden mittels PCR unter Verwendung des DIG labelling mix (Roche) und der in Tab. 9 aufgelisteten Primer nach Angaben des Herstellers generiert. Die DNA-Sonden wurden für 5 min bei 95°C denaturiert und zur Prähybridisierungslösung (DIG Easy Hyb Buffer) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 46°C im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation. Daraufhin wurde die Membran 2 Mal für jeweils 5 min bei 42°C in 25 ml (2x SSC / 0,1% SDS) und 2 Mal für jeweils 30 min bei RT in 25 ml (0,1x SSC / 0,1% SDS) gewaschen. Die Membran wurde dann für 30 min bei RT in einer Blockierlösung [0,1 M Maleinsäure pH 7,5 / 0,15 M NaCl / 1% blocking reagent (Roche)] geblockt und dann mit einem anti-DIG-Antikörper (Roche, 1:10000 in Blockierlösung) für 1,5 h bei RT inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte für jeweils 15 min bei RT in (0,1 M Maleinsäure pH 7,5 / 0,15 M NaCl) und ein 2-minütiger Waschschrte bei RT in (0,1 M Tris-HCl pH 9,5 / 0,1 M NaCl / 5 mM MgCl₂). Schließlich wurde die Membran für 5 min lichtgeschützt mit CDP-Star Reagent (Roche) inkubiert und das Signal unter einer CCD-Kamera (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare) detektiert.

10x TBE

Tris	108 g
Borsäure	55g
EDTA (500 mM, pH8)	40 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

20x SCC, pH 7

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M
DEPC	0,1 %

Tab. 9: Primer zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden zur Detektion von RNA. Diese Primer sind veröffentlicht in (Serra et al., 2016).

DNA-Sonde gegen	Primernamen	Sequenz (5'→3')
RprA	<i>rprA_f</i>	acggtataaatcaacatattg
	<i>rprA_r</i>	taaaaaaagcccatcgt
RybB	<i>rybB_f</i>	gggccaagcttgaaatttttgcaaacgc
	<i>rybB_r</i>	ccggaattctaacaaaaacccatcaacctg
5S rRNA	5S rRNA_f	tgctggcagttccctact
	5S rRNA_r	tgctggcggcagtag

3.9 Enzym- und Extraktionsmethoden

3.9.1 β -Galaktosidase-Aktivitätstest

Um Rückschlüsse auf die Promotoraktivität und somit auf die Expression eines Gens ziehen zu können, wurde die Aktivität einer zur Genregulatorsequenz fusionierten β -Galaktosidase (*GenX::lacZ*) ermittelt. Ein solcher β -Galaktosidase-Aktivitätstest erfolgte nach Angaben von Miller (Miller, 1972, 1992), wobei die Aktivität in μmol gespaltenes Substrat (ONPG) pro Minute und mg Zellprotein angegeben wird. Im Unterschied zum Miller-Protokoll wurde die optische Dichte einer Flüssigkultur bei 578 nm bestimmt und die Absorption des Spaltungsprodukts o-Nitrophenol bei 415 nm gemessen. Für die Aktivitätsbestimmung einer Reportergenfusion aus einer flüssigen Bakterienkultur wurde bei einer bestimmten OD_{578} ein geeignetes Kulturvolumen für 10 min bei 13000 rpm pelletiert, das Pellet daraufhin in 1 ml 1x Z-Puffer resuspendiert und für den β -Galaktosidase-Aktivitätstest herangezogen. Für die Probenentnahme aus 1 d und 2 d alten Makrokolonien wurden diese zunächst in 1x Z-Puffer vollständig resuspendiert. Von der resultierenden Zellsuspension wurde zum einen die OD_{578} bestimmt und zum anderen eine geeignete Menge entnommen, diese auf 1 ml mit 1x Z-Puffer aufgefüllt und in den β -Galaktosidase-Aktivitätstest eingesetzt. Die nachfolgenden Schritte wurden für sämtliche Proben durchgeführt. Durch die Zugabe von jeweils 2 Tropfen 0,1 % SDS und Chloroform, 10-sekündiges Vortexen und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200 μl ONPG (4 mg / ml) initiiert und bei einer leichten Gelbfärbung der Probe mit 500 μl 1M Na_2CO_3 abgestoppt. Daraufhin wurden die Proben für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Absorption des Überstandes mithilfe eines Microplate readers bei 415 nm gemessen. Als Referenzwert diente ein Probenansatz, der aus 1x Z-Puffer mit sämtlichen Zusätzen, aber ohne Zellsuspension bestand. Die Berechnung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{3,38 \times E(415\text{nm})}{\text{OD}(578\text{nm}) \times V \times \Delta t} = \text{spezifische } \beta\text{-Galaktosidase-Aktivität } [\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}]$$

E = Absorption bei 415 nm
 OD = optische Dichte bei 578 nm
 V = eingesetztes Probenvolumen [ml]
 Δt = Reaktionszeit [min]

Z-Puffer (1x), pH 7

Na_2HPO_4	61 mM
NaH_2PO_4	39 mM
KCl	10 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mM
ddH ₂ O	ad 1 l

3.9.2 Extraktion von c-di-GMP zur Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung zellulärer c-di-GMP Konzentrationen wurden zunächst 10 ml einer Bakterienkultur, die bei 28°C in LB-Medium auf eine $OD_{578} = 3$ angezogen wurde, für 28 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert. Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Folgeschritte bei 4°C unter dem Abzug durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 150 µl HPLC-gereinigtem H₂O (Roth) resuspendiert und in ein 2 ml-Safe-Seal-Reaktionsgefäß (mit Schraubdeckel) überführt. Nach Zugabe von 600 µl einer Acetonitril(Roth HN40.2)/Methanol(Roth HN41.2)-Lösung (1/1) wurde die Probe für 30 sek gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min im Heizblock bei 95°C erhitzt, bevor sie für ca. 2 min auf Eis abgekühlt wurde. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 12700 rpm wurde der Überstand in ein 2 ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt. Das Pellet wurde mit 200 µl einer Lösung aus Acetonitril/Methanol/HPLC-H₂O (2/2/1) überschichtet, mittels Vortexen gelöst und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 12700 rpm wurde der Überstand mit dem zuvor abgenommenen Überstand vereinigt, wohingegen das Pellet nochmals in 200 µl Acetonitril/Methanol/HPLC-H₂O (2/2/1) mittels Vortexen gelöst, 15 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 12700 rpm zentrifugiert wurde. Dieser dritte Überstand wurde mit den vorigen Überständen vereinigt und über Nacht in einem Metallblock bei -20°C gelagert, was der vollständigen Proteinpräzipitation diente. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt für 13 min bei 12700 rpm. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäß überführt und in einer Speed-Vac bei mittlerer Stufe (ca. 45°C) eingedampft. Die c-di-GMP-Messungen wurden in der ZFA Metabolomics an der Medizinischen Hochschule Hannover unter Leitung von Prof. Volkhardt Kaeffer durchgeführt. Bei der Berechnung der c-di-GMP-Konzentrationen wurde zugrundegelegt, dass 1 ml Bakterienkultur bei $OD_{578} = 1$ 107 µg Protein enthält. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{c [nM] \times V_A [ml]}{V_K [ml] \times OD \times 0,107mg} = \frac{c-di-GMP [pmol]}{protein [mg]}$$

- c = gemessene Konzentration der in V_A gelösten Probe (Daten aus ZFA Metabolomics)
- V_A = Volumen, in dem die eingedampfte Probe zur Messung aufgenommen wurde (hier 0,2 ml)
- V_K = abgenommenes Kulturvolumen (hier 10 ml)
- OD = optische Dichte bei 578 nm

Die Bestimmung zellulärer c-di-GMP Konzentrationen erfolgte in Triplikaten, wobei die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt sind. Für die c-di-GMP-Extraktion wurden stets W3110-Stämme (Curli-Synthese) verwendet, da die Probenaufbereitung besser funktioniert als mit AR3110-Stämmen (Curli- und Cellulose-Synthese).

3.10 Datenbanken und computergestützte Analysen

Für die Sequenz- und Funktionsanalyse von Genen und Proteinen wurden die Online-Datenbanken CBS Prediction Server (www.cbs.dtu.dk), EcoCyc (www.ecocyc.org), ExPASy (www.expasy.org), NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) und TOPCONS verwendet. Die Auswertung von Sequenzierungsergebnissen sowie die Konstruktion von Primern wurden mithilfe von SerialCloner 2-6-1 und OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Regulation und Wirkungsweise der Diguanylatzyklase DgcE

Im Fokus dieser Arbeit stand die detaillierte Analyse der Diguanylatzyklase (DGC) DgcE, welcher eine Hauptrolle in der Aktivierung der c-di-GMP-vermittelten *csgD*-Expression und folglich der Synthese von Biofilmmatrixkomponenten zukommt. DgcE ist nicht nur der bei weitem größte, sondern auch strukturell komplexeste Vertreter der GGDEF-/EAL-Domänenproteine in *E. coli* K12 (Hengge et al., 2016; Povolotsky and Hengge, 2016). Der N-Terminus ist mit 10 Transmembrandomänen in der inneren Membran verankert, wobei die ersten 8 Transmembransegmente als MASE1-Domäne beschrieben sind (Nikolskaya et al., 2003). Daran schließt sich der cytoplasmatische Proteinanteil mit drei aufeinanderfolgenden PAS/PAC-Domänen, einer GGDEF- und einer degenerierten EAL-Domäne an (vgl. 1.3). Die Vielzahl an Domänen bietet großes Potential zur Signalintegration sowie Regulation von und durch DgcE. Um ein vertieftes Verständnis der Rolle und Wirkungsweise von DgcE zu erlangen, wurde anhand von umfassenden genetischen Analysen zum einen die Funktion einzelner Domänen erörtert und zum anderen der regulatorische Einfluss zweier weiterer Proteine untersucht – YjdA und Yjcz.

4.1.1 Einfluss einzelner DgcE-Domänen auf die Synthese der Biofilmmatrix

4.1.1.1 Erzeugung verschiedener chromosomaler *dgcE*-Mutanten

Um die Bedeutung von einzelnen Domänen für die DgcE-Aktivität untersuchen zu können, wurden verschiedene Mutationen innerhalb von *dgcE* erzeugt. Da DgcE die *csgD*-Expression über den auf diversen Protein-Protein-Interaktionen beruhenden PdeR/DgcM/MlrA-Komplex kontrolliert, ist die Stöchiometrie aller beteiligten Komponenten von großer Bedeutung. Daher sollten die Auswirkungen der *dgcE*-Mutationen zunächst anhand chromosomaler Expression verfolgt werden und nicht anhand von überexprimierenden Multikopien-Vektoren.

Zu diesem Zweck wurden mithilfe der Zwei-Schritt-Inaktivierung (vgl. 3.6.15) verschiedene chromosomale *dgcE*-Mutanten hergestellt, die Punktmutationen aufweisen (*dgcE*^{GGAFF}) oder denen einzelne Domänen fehlen (*dgcE*^{ΔEAL}, *dgcE*^{ΔPAS3}, *dgcE*^{ΔTM}, *dgcE*^{ΔTMΔEAL}). Hierbei wurden die zehn Transmembransegmente (TM) sowie die drei PAS-Domänen (PAS3) als eine Einheit betrachtet (Abb. 6). Um dem Auftreten von fehlgefalteten Proteinen aufgrund interner Deletionen entgegenzuwirken, wurden die Linkerregionen zwischen den Domänen beibehalten, sodass die einzelnen Domänen zu einer korrekten Faltung befähigt sind.

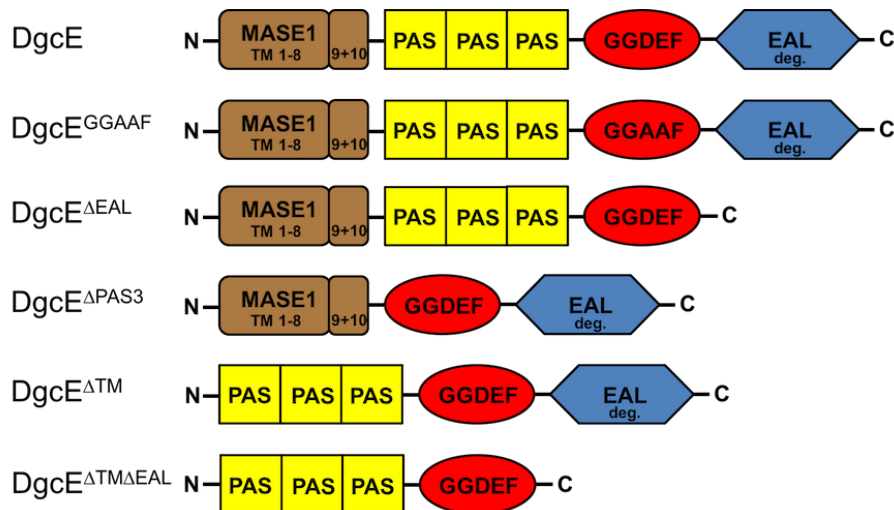


Abb. 6: Kodierte Proteindomänenstrukturen der hergestellten chromosomalen *dgcE*-Mutanten. Chromosomale Punktmutationen sowie Deletionen von Proteindomänen-kodierenden DNA-Sequenzen erfolgten mittels der Zwei-Schritt-Inaktivierung (vgl. 3.6.15), wobei darauf geachtet wurde, dass Linkerregionen beibehalten wurden. Die Veränderung des aktiven Zentrums der GGDEF-Domäne (*DgcE*^{GGAAF}) bewirkt den Verlust der Zykaseaktivität. Bei *DgcE*^{ΔPAS3} handelt es sich um eine *DgcE*-Variante, der alle 3 PAS-Domänen fehlen, *DgcE*^{ΔTM}- und *DgcE*^{ΔTMΔEAL} sind lösliche Varianten, denen alle 10 Transmembrandomänen fehlen. Aufgrund fehlender Aminosäuremotive, die für c-di-GMP-Bindung und -Katalyse vonnöten sind, gilt die EAL-Domäne als degeneriert (deg.).

4.1.1.2 *DgcE*-Aktivität erfordert die TM-, PAS- und GGDEF-Domänen, die EAL_{deg}-Domäne wirkt ihr entgegen

Um Rückschlüsse auf die Funktion einzelner Domänen ziehen zu können, wurden sämtliche in Kapitel 4.1.1.1 beschriebenen *dgcE*-Mutanten (für kodierte Proteinstrukturen vgl. Abb. 6) bezüglich ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung analysiert.

Hierzu kamen zum einen Makrokolonie-Experimente zum Einsatz (Abb. 7A), wobei die Anzucht der Makrokolonien auf Kongorot-haltigem Medium erfolgte, da Kongorot extrazelluläre Proteine sowie Polysaccharide bindet, anfärbt und somit das Vorhandensein extrazellulärer Matrixsubstanzen anzeigt (Hammar et al., 1995). Als Stammhintergrund wurde der AR3110 gewählt – ein *E.coli* K12 W3110-Derivat, dessen Cellulosesynthese aufgrund einer Punktmutation innerhalb von *bcsQ* wiederhergestellt worden ist (Serra et al., 2013a). Dieser Stamm produziert demnach Curli-Fimbrien und pEtN-Cellulose als extrazelluläre Biofilmmatrixkomponenten, die durch Kongorot anfärbbar sind.

Zum anderen wurden anhand von Flüssigkulturen die zellulären CsgD-Mengen mittels Immunoblotdetektion analysiert und die Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterergenfusion in den *dgcE*-Mutanten verfolgt, was quantitative Vergleiche erlaubte (Abb. 7B & C).

Der für extrazelluläre Matrixexpression unabdingbare Masterregulator CsgD stimuliert direkt die Expression des für Curli-Fimbrien kodierenden *csgBAC*-Operons und indirekt über *DgcC* die Cellulosesynthese. Demnach dienen CsgD-Proteinmengen sowie die Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterergenfusion (gemessen anhand der spezifischen β -Galaktosidasaktivität, vgl. 3.9.1) im W3110- und AR3110-Stammhintergrund gleichermaßen als Indikatoren der Matrixsynthese.

Wildtypische AR3110-Makrokolonien wiesen eine tiefrote Färbung sowie eine komplexe Struktur mit großflächiger flacher Basis und hoch aufragenden Stegen auf (Abb. 7A, oben links). CsgD akkumulierte in der Stationärphase (Abb. 7B), womit die Expression der *csgB::lacZ*-Reporterfusion einher ging. Diese war zunächst kaum detektierbar, nahm erst ab dem Übergang in die Stationärphase deutlich zu und erreichte schließlich ein Plateau (Abb. 7C).

Im Vergleich dazu bildete die *dgcE*-Deletionsmutante erwartungsgemäß einen Makrokolonie-Phänotypen aus, der eine drastisch reduzierte Synthese von Curli-Fimbrien und pEtN-Cellulose widerspiegelte. Die verminderte Struktur und Rotfärbung der Makrokolonie wurde durch eine um etwa die Hälfte reduzierte zelluläre CsgD-Menge und *csgB::lacZ*-Expression begleitet (Abb. 7). In gleichem Maße reduzierte Koloniemorphologien, CsgD-Mengen und *csgB::lacZ*-Expressionen waren detektierbar für *dgcE*-Mutanten, die für keine PAS- bzw. TM-Domänen kodieren (*dgcE*^{ΔPAS3}, *dgcE*^{ΔTM}) sowie für die *dgcE*-Mutante, die anstelle des wildtypischen GGDEF-Motivs ein GGAAF-Motiv innerhalb der GGDEF-Domäne aufweist und deren katalytisch aktives Zentrum (A-site) somit nicht mehr funktional ist (D763A/E764A = *dgcE*^{GGAAF}) (Abb. 7). Die beobachtete Reduktion der Biofilmbildung resultierte nicht aus verminderter Proteinexpression der entsprechenden DgcE-Varianten (vgl. 4.1.2, Abb. 10), sodass den GGDEF-, PAS- und TM-Domänen eine aktivierende Funktion hinsichtlich der DgcE-vermittelten Matrixsynthese zugeschrieben werden konnte.

Eine Deletion der degenerierten C-terminalen EAL-Domäne (*dgcE*^{ΔEAL}) hingegen resultierte in einem für erhöhte Matrixproduktion typischen Phänotypen (vgl. 1.2.2, Abb. 4), wobei die Makrokolonie neben einer intensiven Rotfärbung eine im Vergleich zum Wildtypen größere und flachere Ausprägung mit höheren aber weniger Stegen aufwies (Abb. 7A). Während keine eindeutig erhöhten zellulären CsgD-Mengen beobachtet werden konnten (was an einer Sättigung des detektierten Signals aufgrund bereits hoher Werte im Wildtypen liegen könnte), war die Expression der *csgB::lacZ*-Reporterfusion bei Abwesenheit der EAL_{deg}-Domäne stark erhöht (Abb. 7B & C). Somit wirkt die EAL_{deg}-Domäne der DgcE-vermittelten Matrixproduktion entgegen. Der Effekt dieser ΔEAL-bedingten Matrixüberproduktion war abhängig vom Vorhandensein der TM-Domäne, da die *dgcE*^{ΔTMΔEAL}-Mutante einen reduzierten Phänotypen ausbildete, der dem einer *dgcE*-Deletionsmutante glich (Abb. 7).

Anhand von Doppelmutanten, in denen neben den verschiedenen *dgcE*-Mutationen zusätzlich *pdeR* oder *pdeH* deletiert sind, konnte außerdem die Wirkungsposition von DgcE innerhalb der Biofilmmatrix-Kontrollkaskade bestätigt werden (Abb. 7A). Da PdeH als Master-PDE für massiven c-di-GMP-Abbau sorgt und PdeR als Trigger-Enzym einen negativen Einfluss auf die *csgD*-Transkription hat, bewirkt die Deletion dieser beiden Genprodukte stark erhöhte Matrixbildung, was wiederum zu tiefroten größeren und flacheren Kolonien mit weniger, aber höheren Stegen führte (vgl. 1.2.2, Abb. 4).

Keine der *dgcE*-Mutationen zeigte in einem $\Delta pdeR$ -Stammb Hintergrund Auswirkungen. Die Doppelmутanten glichen stets einer *pdeR*-Einzeldelentionsmutante (Abb. 7A). Bei Abwesenheit von PdeR hat die Aktivität von DgcE demnach keinerlei Auswirkung mehr und ist folglich dem *csgD*-regulierenden PdeR/DgcM/MlrA-Modul vorangeschaltet.

In einem $\Delta pdeH$ -Stammb Hintergrund machten *dgcE*-Mutationen hingegen einen Unterschied, wobei intermediäre Phänotypen von $\Delta pdeH$ und *dgcE*-Mutante zu beobachten waren (Abb. 7A). DgcE und PdeH wirken demnach auf gleicher Ebene des Matrix-Kontrollnetzwerkes (mit antagonistischen DGC- bzw. PDE-Funktionen).

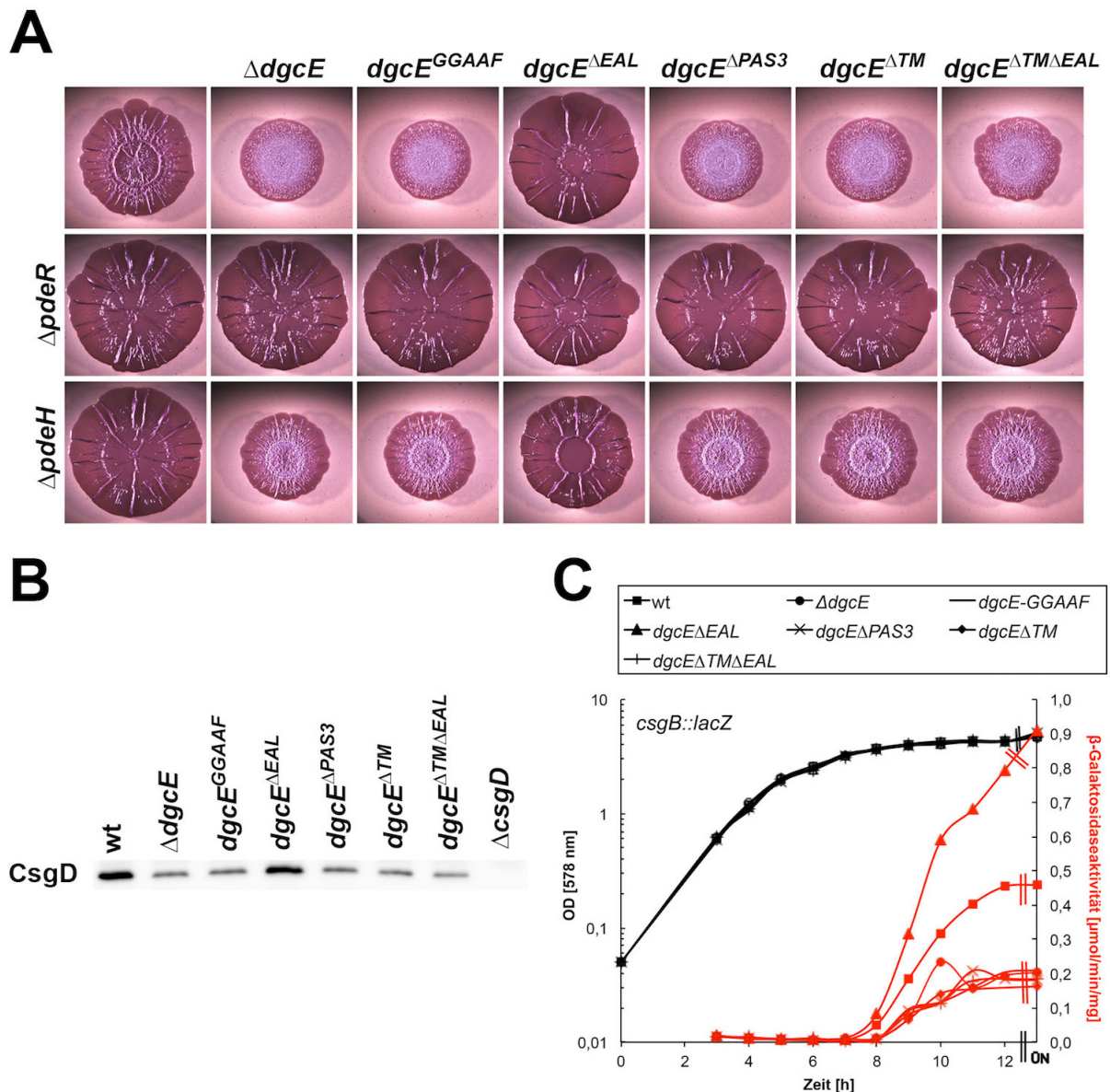


Abb. 7: Die GGDEF-vermittelte Zyklastaseaktivität sowie die sensorischen TM- und PAS-Domänen sind notwendig für DgcE-vermittelte Biofilmmatrixsynthese, wohingegen die EAL_{deg}-Domäne dieser entgegenwirkt. (A) Makrokolonien von AR3110 (oben links) sowie Derivaten (vgl. Abb. 6) wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. **(B)** Immunoblotdetektion von CsgD aus in (A) verwendeten *dgcE*-Mutanten nach Wachstum in LB bei 28 °C bis zu einer OD₅₇₈ = 3,7. 6 μ g Gesamtprotein wurden in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mithilfe eines CsgD-spezifischen Antikörpers detektiert. **(C)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterexpression in W3110 Δ *lac*(*I*-A) (wt) und Derivaten entlang der Wachstumskurve in LB bei 28 °C. Der Übernachtswert (ÜN) entspricht 28 h Wachstum.

Die Auswirkung verschiedener chromosomaler *dgcE*-Mutationen auf die Biofilmmatrixsynthese zeigte, dass die GGDEF-vermittelte Zyklaseaktivität - und somit c-di-GMP-Produktion - sowie die sensorischen PAS- und TM-Domänen essentiell für die DgcE-vermittelte *csgD*- und somit Matrixproduktion sind (vgl. *dgcE*^{GGAAF}, *dgcE*^{ΔPAS3}, *dgcE*^{ΔTM}).

Die degenerierte EAL-Domäne hingegen übt einen inhibitorischen Effekt aus, der abhängig von der TM-Domäne ist und verloren geht, sobald DgcE löslich vorliegt (vgl. *dgcE*^{ΔEAL}, *dgcE*^{ΔTM} und *dgcE*^{ΔTMΔEAL}). Der komplett reduzierte Phänotyp der *dgcE*^{ΔTMΔEAL} weist zudem darauf hin, dass die TM-Domäne dem inhibitorischen Effekt der EAL-Domäne nicht entgegenwirkt, sondern unabhängig von der EAL-Domäne aktivierend wirkt.

4.1.1.3 Dimerisierung von DgcE wird durch die PAS-Domänen vermittelt

Die Aktivität von Diguanylatzyklasen (DGCs) erfordert deren Dimerisierung, wobei beide Monomere mithilfe ihrer GGDEF-Domänen jeweils ein GTP-Substrat binden und letztlich c-di-GMP-Synthese ermöglichen. Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die DGC-Aktivität von DgcE essentiell für Biofilmmatrixproduktion ist (siehe *dgcE*^{GGAAF} in 4.1.1.2), sodass Dimerisierungsprozesse eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von DgcE spielen müssen. Im Folgenden sollte daher näher untersucht werden, welche Domänen von DgcE an der Dimerisierung beteiligt sind.

Zu diesem Zweck wurden Bacterial-Two-Hybrid(BTH)-Studien durchgeführt, die auf der interaktionsvermittelten Wiederherstellung der Adenylatzyklase(CyaA)-Aktivität in Bakterien beruhen, was die cAMP-abhängige Verstoffwechselung alternativer Kohlenstoffquellen ermöglicht (Karimova et al., 1998). An die zu testenden Proteinsequenzen wurden mithilfe spezifischer Plasmide jeweils eine für die CyaA-Untereinheiten T25 bzw. T18 kodierenden Sequenzen fusioniert und in einem Δ*cyaA*-Stamm co-exprimiert. Lediglich bei einer Interaktion der getesteten Proteine wird die Adenylatzyklaseaktivität wiederhergestellt, was aufgrund von fermentativem Abbau alternativer Kohlenstoffquellen auf Indikatormedium als Rotfärbung sichtbar wird. Bei fehlender Protein-Protein-Interaktion kommen weiße Kolonien zustande.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte DgcE-Dimerisierung nur dann beobachtet werden, wenn die CyaA-Untereinheiten an den C-Terminus von DgcE fusioniert waren (DgcE-T25/18 von pKNT25 bzw. pUT18). Lag die T25/18-Fusion N-terminal vor (T25/18-DgcE von pKT25 bzw. pUT18C), konnte keine DgcE-Dimerisierung ausgemacht werden, weshalb die gesamte Dimerisierungsstudie mit C-terminal fusioniertem T25 bzw. T18 durchgeführt wurde. Sowohl die Dimerisierung einzelner DgcE-Domänen wurde untersucht, als auch die von DgcE-Varianten, denen eine oder mehrere Domänen fehlten. Negativkontrollen (Ansätze mit Leerplasmiden) und die Positivkontrolle (zip-zip) dienten zu Referenzzwecken (Abb. 8).

Anhand der oben beschriebenen Interaktionsexperimente wird deutlich, dass die für Zyklaseaktivität notwendige DgcE-Dimerisierung nicht durch die GGDEF-Domäne allein erfolgt, sondern vornehmlich durch die PAS-Domänen vermittelt wird. Da jedoch auch das Fehlen der PAS-Domänen eine Dimerisierung (zwar deutlich vermindert) zulässt, ist davon auszugehen, dass neben den PAS-Domänen noch weitere Domänen an einer Dimerisierung beteiligt sind (vgl. Diskussion 5.1.1).

4.1.2 Proteolyse von DgcE

Im Vorfeld dieser Promotionsarbeit wurde in der AG Hengge bereits beobachtet, dass die GGDEF-/EAL-Domänenproteine DgcE und PdeA einer steten Proteolyse ausgesetzt sind [später veröffentlicht in (Sarenko et al., 2017)]. Bemerkenswerterweise sind diese beiden Proteine die einzigen in *E. coli* K12 exprimierten DGC-/PDE-Proteine, die eine intakte N-terminale MASE1-Domäne aufweisen (vgl. Tab. 1). Da proteolytische Ereignisse einen wichtigen Einfluss auf zelluläre Proteinmengen und Expressionskontrolle zur Folge haben, wurde die Proteolyse von DgcE hier näher untersucht. Zudem sollte sichergestellt werden, dass die in Kapitel 4.1.1 beschriebenen *in vivo* Aktivitätsunterschiede der DgcE-Varianten nicht auf unterschiedlicher Proteinexpression beruhen.

4.1.2.1 DgcE wird in sämtlichen Wachstumsphasen abgebaut

Zunächst wurde mithilfe eines 3xFLAG-spezifischen Antikörpers die Expression von chromosomal kodiertem DgcE::3xFLAG (hergestellt von Dr. Gisela Klauck) entlang der Wachstumskurve verfolgt. Der C-terminale 3xFLAG-tag wirkte sich dabei nicht negativ auf die Biofilmbildung und somit die Funktionalität von DgcE aus (vgl. Makrokolonie von *dgcE::3xFLAG* in Abb. 10A).

In sämtlichen Wachstumsphasen konnte ein charakteristisches Bandenmuster beobachtet werden, das auf massiven Abbau von DgcE::3xFLAG schließen ließ und dessen Intensität ab dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase deutlich zunahm (Abb. 9B). Auffällig war, dass eine dem Volllängenprotein entsprechende Bande (126 kDa) kaum auszumachen war und DgcE::3xFLAG folglich hauptsächlich in prozessierter Form vorlag. Dabei ist zu beachten, dass lediglich solche Fragmente sichtbar wurden, die den C-terminalen 3xFLAG-tag beinhalteten (Abb. 9A). N-terminale Fragmente ohne 3xFLAG-tag konnten demnach nicht detektiert werden. Ab einer $OD_{578} = 2,5$ blieb die Intensität der einzelnen Banden ähnlich stark. Lediglich eine ca. 30 kDa große Bande (* in Abb. 9B), die der C-terminalen degenerierten EAL-Domäne entspricht (vgl. Abb. 11), wurde über den gesamten Wachstumsverlauf stärker.

Zur weiteren Klärung der Proteolyse wurde chromosomales *dgcE* mit einem N-terminalen 3xFLAG-tag versehen. Ein solches Konstrukt war jedoch mittels Immunoblotanalysen nicht detektierbar.

Aufgrund dieses Befundes sowie der Tatsache, dass die Analyse von DgcE::3xFLAG in zahlreichen Banden resultierte, die sich größtenteils über die gesamte Länge von DgcE erstreckten, kann davon ausgegangen werden, dass DgcE prozessiv vom N-Terminus her abgebaut wird, wobei die einzelnen Fragmente in der Zelle akkumulieren.

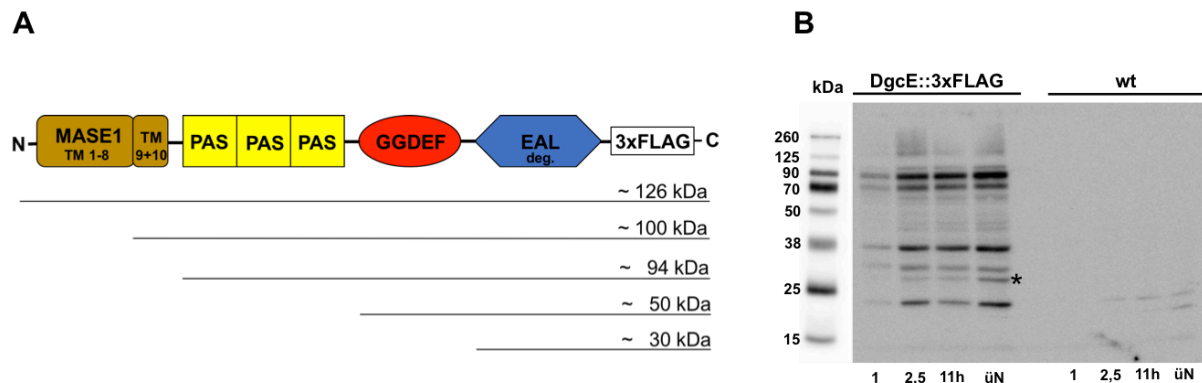


Abb. 9: DgcE unterliegt in sämtlichen Wachstumsphasen einer massiven Proteolyse. (A) Schematische Darstellung von C-terminal 3xFLAG-markiertem DgcE und der erwarteten Fragmentgrößen, wenn ausgehend vom N-Terminus einzelne Domänen prozessiert werden. **(B)** Immunoblot zur Detektion von chromosomal kodiertem DgcE::3xFLAG in unterschiedlichen Wachstumsphasen mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers. Das Wachstum eines W3110 *dgcE::3xFLAG* Stammes und eines W3110 Stammes ohne 3xFLAG-fusioniertem Gen (wt) als Kontrolle erfolgte in LB bei 28 °C. Proben wurden bei einer OD₅₇₈ = 1 und 2,5 genommen sowie nach 11 h und 24 h (üN) Wachstum. Sichtbar sind lediglich solche Fragmente, die den C-terminalen 3xFLAG-tag beinhalten. Der Stern (*) zeigt eine Bande von ca. 30 kDa an, die mit zunehmendem Zellwachstum stärker wurde und der EAL_{deg.}-Domäne entspricht (vgl. Abb. 11). Die Proben samt Marker wurden auf dasselbe Gel geladen. Aufgrund unterschiedlich starker Signalintensitäten während der Detektion wurde der Markerbereich weniger stark kontrastiert. Ein Bereich zwischen Marker und den Proben wurde entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden.

4.1.2.2 Proteolyse und Aktivierung von DgcE erfordern seine TM-Region

Für die Immunoblotdetektion sämtlicher DgcE-Varianten (vgl. Abb. 6) wurde ein 3xFLAG-tag an den C-Terminus der proteinkodierenden Sequenzen fusioniert (vgl. 3.6.16). Somit wurden chromosomal kodierte Fusionsproteine generiert, die der Kontrolle des natürlichen *dgcE*-Promotors unterliegen und deren Proteinexpression in verschiedenen Wachstumsphasen verfolgt werden konnte.

Mithilfe von Makrokolonie-Experimenten wurde deutlich, dass sich diese Mutanten (mit 3xFLAG-fusionierten *dgcE*-Varianten im W3110-Stammhintergrund) in ihrer Biofilmbildung ähnlich verhalten wie solche ohne C-terminale Fusionen (vgl. Abb. 7A mit Abb. 10A) und sich die C-terminale Markierung somit nicht negativ auf die Funktionalität der kodierten DgcE-Varianten auswirkt. Während im W3110-Stammhintergrund eine *dgcE*^{ΔEAL}::3xFLAG-Mutante mehr Curli produzierte als der Wildtyp, blieben 3xFLAG-markierte *dgcE*^{ΔPAS}-, *dgcE*^{ΔTM}- und *dgcE*^{ΔTMΔEAL}-Mutanten in ihrer Curli-Synthese reduziert (Abb. 10A).

Westernblotanalysen von chromosomalen C-terminal 3xFLAG-markierten *dgcE*-Mutanten ergaben, dass sowohl in Flüssig- (Abb. 10B) als auch auf Festmedium (Abb. 10C) charakteristische DgcE-Degradationsmuster entstehen. Zudem war keine der *dgcE*-Mutanten in ihrer Proteinexpression (DgcE-Varianten) beeinträchtigt, sodass die zuvor beobachteten *in vivo* Aktivitätsunterschiede (vgl. 4.1.1.2) nicht auf veränderte Expressionen zurückzuführen sind.

Lösliche DgcE-Varianten waren sehr stabil und akkumulierten als eine intensive, der erwarteten Größe entsprechenden Bande ($\Delta TM \sim 90$ kDa, $\Delta TM\Delta EAL \sim 65$ kDa) (Abb. 10B & C). Für all jene Varianten, die die zehn Transmembrandomänen (TM) von DgcE aufweisen, war in Form von charakteristischen Bandenmustern ein massiver proteolytischer Abbau zu beobachten, wobei - wie bereits für DgcE::3xFLAG beschrieben - keine bzw. lediglich sehr schwache Volllängenbanden beobachtet werden konnten (DgcE ~ 126 kDa, $\Delta EAL \sim 100$ kDa, $\Delta PAS3 \sim 80$ kDa). Vielmehr waren v. a. bei DgcE und ΔEAL prominente Banden ersichtlich, welche den jeweils löslichen Proteinanteilen entsprachen (~ 90 kDa bzw. ~ 65 kDa).

Nach ca. 24 h Wachstum (ÜN) in LB-Flüssigmedium war für ΔEAL allerdings zusätzlich eine große Bande auszumachen, die auf Oligomerisierung dieser Variante schließen ließ (Abb. 10B, vgl. Diskussion 5.1.2).

Es wurde deutlich, dass die Transmembranregion von DgcE für die massive Proteolyse vonnöten ist, was zusätzlich darauf hinweist, dass die Proteolyse vom N-Terminus her erfolgt. Außerdem legen diese Befunde nahe, dass eine oder mehrere membranständige Proteasen am Abbau von DgcE beteiligt sind.

Um zu klären, ob die beobachtete Degradation speziell der Transmembrandomänen von DgcE oder lediglich der Verankerung in der Membran bedarf, wurde eine weitere chromosomale *dgcE*-Mutante kreiert und mit einem C-terminalen 3xFLAG-tag versehen. Diese kodiert anstelle der zehn DgcE-eigenen Transmembrandomänen für die ersten beiden Transmembrandomänen der Laktose-Permease LacY (TM1+2^{LacY}::DgcE ΔTM ::3xFLAG ~ 100 kDa), sodass der lösliche Teil von DgcE zwar in der inneren Zellmembran verankert wird, allerdings vom Signaleingang der sensorischen MASE1-Domäne entkoppelt ist.

Diese DgcE-Variante wies eine deutlich geringere Degradation auf als DgcE::3xFLAG (Abb. 10B & C), was zeigte, dass die DgcE-eigene TM für einen massiven Abbau nötig ist. Da aber durchaus Abbaubanden ersichtlich wurden, scheint die Transmembranregion von DgcE in Hinblick auf die Proteolyse weniger als spezifische Signalsequenz für proteolytische Angriffe zu agieren, sondern eher der Membranlokalisation zu dienen, wo der Zugriff einer membranständigen Protease erfolgen kann.

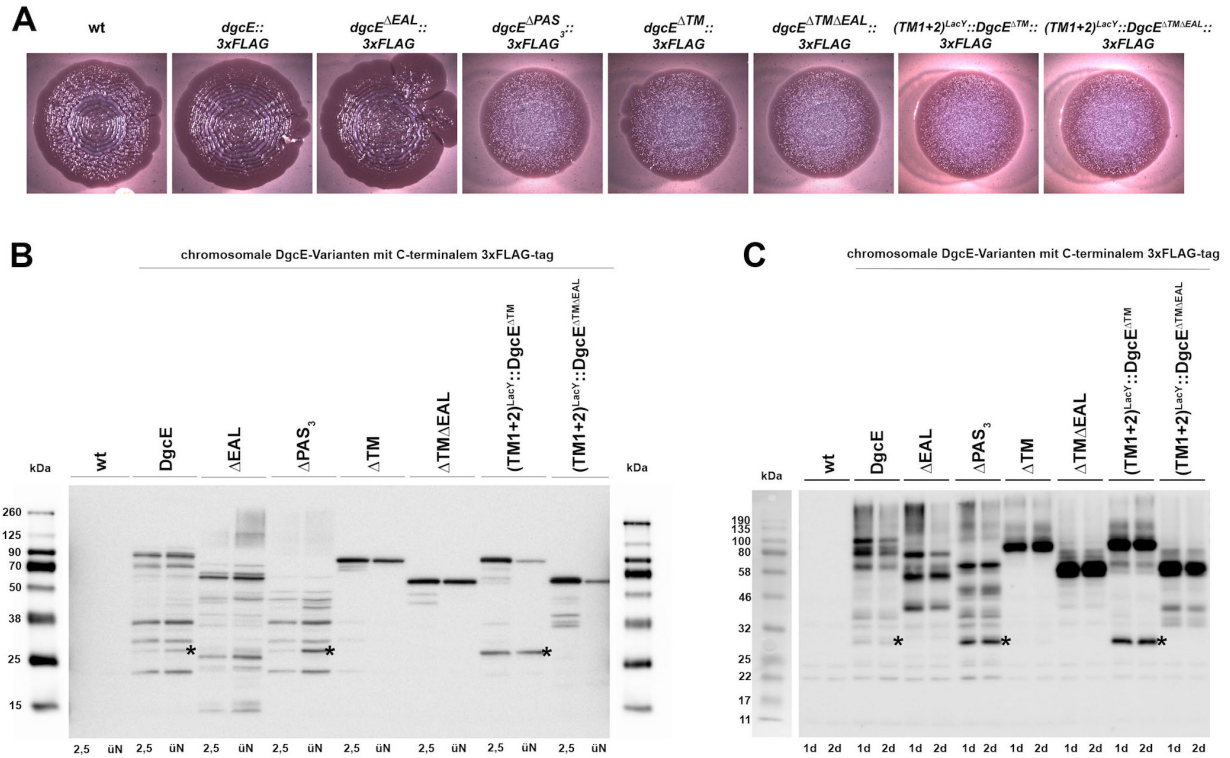


Abb. 10: Funktionalität, Expression und Proteolysemuster sämtlicher chromosomal kodierter 3xFLAG-markierter DgcE-Varianten. (A) Makrokolonien von W3110 (wt) und Derivaten mit chromosomal 3xFLAG-markierten *dgcE*-Varianten wurden durch das Tropfen von 5 µl Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. (B) Immunoblotdetektion der 3x-FLAG-markierten DgcE-Varianten nach Wachstum entsprechender W3110-Derivate (siehe A) in Flüssigmedium (LB) bei 28 °C. Probenahmen erfolgten bei einer OD₅₇₈ = 2,5 und nach 24 h (ÜN). (C) Immunoblotdetektion unterschiedlicher 3x-FLAG-markierter DgcE-Varianten aus 1 d bzw. 2 d alten Makrokolonien (Wachstum auf LBnoS-Medium bei 28 °C) entsprechender W3110-Derivate (siehe A). Als Kontrolle diente stets ein W3110-Stamm ohne 3xFLAG-fusioniertes Gen (wt). Die Detektion von 3xFLAG-markierten DgcE-Varianten erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers. Sichtbar sind lediglich solche Fragmente, die den C-terminalen 3xFLAG-tag beinhalten. Der Stern (*) zeigt eine Bande von ca. 30 kDa an, die der degenerierten EAL-Domäne von DgcE entspricht (vgl. Abb. 11). Die Proben samt Marker wurden stets auf dasselbe Gel geladen. Aufgrund unterschiedlich starker Signalintensitäten während der Detektion wurde der Markerbereich in (B) weniger stark kontrastiert. Einige Bereiche zwischen Marker und den Proben wurden entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden.

Auffällig war eine prominente ca. 30 kDa große Abbaubande von 3xFLAG-markiertem TM1+2^{lacY}::DgcE^{ΔTM} (*in Abb. 10B & C). Diese entsprach der bereits in 4.1.2.1 beschriebenen Bande, die im Verlaufe des Zellwachstums an Intensität gewann (* in Abb. 9B) und aufgrund ihrer Größe das EAL_{deg}-Fragment darstellte. Bei DgcE-Varianten, denen die EAL_{deg}-Domäne fehlte (ΔEAL, ΔTMΔEAL, TM1+2^{lacY}::DgcE^{ΔTMΔEAL}) wurde eine solche Bande nicht ersichtlich. Einen zusätzlichen Hinweis dafür, dass diese ca. 30 kDa-Bande der EAL_{deg}-Domäne entspricht, lieferte der Vergleich des Proteolysemusters von chromosomalem 3xFLAG-markiertem DgcE mit plasmidkodiertem 6His-markiertem DgcE und der einzelnen 6His-markierten EAL_{deg}-Domäne (Abb. 11). Hierbei ist zu beachten, dass 6His-markierte Proteinvarianten ca. 2 kDa kleiner sind als 3xFLAG-markierte und die Bandenmuster demnach versetzt zueinander sind. Die inhibierend wirkende degenerierte EAL-Domäne

(siehe hierzu 4.1.1.2) könnte also gesondert prozessiert werden, wofür einfache Membranständigkeit ausreichend wäre (vgl. Diskussion 5.2).

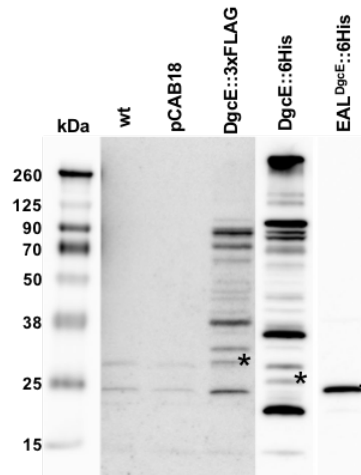


Abb. 11: Zuordnung der EAL_{deg}-Abbaubande im Proteolysemuster von DgcE::3xFLAG. Für die Detektion von chromosomal kodiertem DgcE::3xFLAG sowie plasmidkodiertem (von pCAB18) DgcE::6His und EAL^{DgcE}::6His wurden entsprechende W3110-Derivate für 24 h bei 28 °C in LB (W3110 = wt, W3110 *dgcE*::3xFLAG) bzw. LB/Amp (W3110 mit pCAB18 und Derivaten: pCAB18-*dgcE*::6His und pCAB18-EAL^{DgcE}::6His) kultiviert. Die Expression von pCAB18-EAL^{DgcE}::6His wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Sämtliche Proben wurden auf dasselbe 10 %ige Polyacrylamidgel geladen und durch gleichzeitige Zugabe spezifischer anti-3xFLAG- und anti-6His-Antikörper detektiert. Aufgrund unterschiedlich starker Signalintensitäten während der Detektion wurden Bereiche unterschiedlich stark kontrastiert. Ein Bereich zwischen DgcE::6His und EAL^{DgcE}::6His wurde entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden. Der Stern (*) zeigt die Abbaubande der degenerierten EAL-Domäne von DgcE an.

Bei der Analyse von Biofilmmatrixproduktion anhand von Makrokolonien wurde deutlich, dass Membranständigkeit, vermittelt durch die ersten beiden Transmembrandomänen von LacY, und die Prozessierung der degenerierten inhibitorischen EAL-Domäne allein nicht ausreichend dafür sind, DgcE-Aktivität herzustellen. Die *TM1+2^{LacY}::dgcE^{ΔTM}*- und *TM1+2^{LacY}::dgcE^{ΔTMΔEAL}*-Mutanten zeigten die gleiche reduzierte phänotypische Ausprägung wie eine komplette *dgcE*-Deletionsmutante und eine *dgcE^{ΔTM}*-Mutante (Abb. 12, vgl. mit Abb. & 10A).

Die DgcE-eigenen TM-Domänen sind demnach essentiell für die Aktivität von DgcE und können nicht durch andere TM-Domänen ersetzt werden. Dies lässt eine gesonderte Signalverarbeitung mithilfe der sensorischen MASE1-Domäne vermuten.

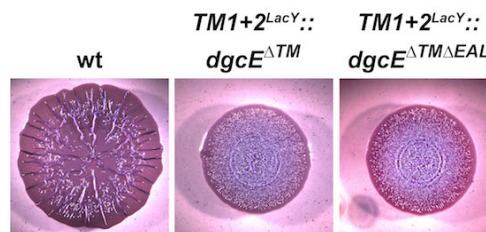


Abb. 12: DgcE-Aktivität erfordert DgcE-eigene Transmembrandomänen. Makrokolonien von AR3110 (wt) sowie Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 µl Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28°C für 5 d erzeugt. DgcE-Varianten, die anstelle der DgcE-eigenen Transmembrandomänen die ersten beiden Transmembrandomänen von LacY aufweisen [*TM1+2^{LacY}::dgcE^{ΔTM}* & *TM1+2^{LacY}::dgcE^{ΔTMΔEAL}*], zeigen den gleichen reduzierten Phänotypen wie eine komplette *dgcE*-Deletionsmutante und eine *dgcE^{ΔTM}*-Mutante (vgl. mit Abb. 7A).

4.1.2.3 Überexpression von DgcE resultiert in verminderter DgcE-Proteolyse

Die Expression sämtlicher DgcE-Varianten wurde außerdem mithilfe von Plasmiden untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden *dgcE*-Gensequenzen mit einem C-terminalen 6His-tag versehen und auf pCAB18 kloniert, wodurch sie der Expressionskontrolle eines *tac*-Promotors unterliegen.

Nach der Überexpression von C-terminal 6His-markiertem DgcE war ein ähnliches Proteolysemuster auszumachen wie für chromosomales 3xFLAG-markiertes DgcE. Gleiches war für die unterschiedlichen DgcE-Varianten zu beobachten, wobei lösliches DgcE ($\Delta\text{TM}::6\text{His}$) im Gegensatz zu membranständigen Varianten, stabil war (Abb. 13).

Für plasmidkodierte DgcE-Varianten, die DgcE-eigene Transmembrandomänen aufweisen ($\text{DgcE}::6\text{His}$, $\text{DgcE}^{\text{GGAAF}}::6\text{His}$, $\Delta\text{EAL}::6\text{His}$, $\Delta\text{PAS3}::6\text{His}$), konnten zudem Fragmente in Form von intensiven Banden ausgemacht werden, die nicht nur größer waren als die erwarteten Vollängenproteine, sondern auch die Größe von Dimeren überstiegen (Abb. 13, vgl. auch $\text{DgcE}::3\text{xFLAG}$ & $\text{DgcE}::6\text{His}$ in Abb. 11). Eine solche Aggregationsbande war besonders stark für $\Delta\text{EAL}::6\text{His}$ (Abb. 13) und konnte bei chromosomal kodierten DgcE-Varianten lediglich für $\Delta\text{EAL}::3\text{xFLAG}$ nach 24 h beobachtet werden (vgl. Abb. 10B).

Für $\text{TM1+2}^{\text{LacY}}::\text{DgcE}^{\Delta\text{TM}}::6\text{His}$ hingegen war keine Aggregation zu beobachten und auf Höhe der EAL_{deg} -Domäne (~ 30 kDa) wurde keine so intensive Bande ersichtlich wie es für die chromosomale 3xFLAG-markierte Variante der Fall war (vgl. Abb. 10 & 13).

Die beobachtete Oligomerisierung der oben beschriebenen Varianten sowie die Stabilisierung von $\text{TM1+2}^{\text{LacY}}::\text{DgcE}^{\Delta\text{TM}}::6\text{His}$ (Abb. 13) deuteten auf verminderte Prozessierung hin, sobald DgcE überexprimiert wird. Dieser Effekt wurde daraufhin näher untersucht mittels *in trans* Überexpression von pCAB18-kodiertem DgcE in einem Stammhintergrund, in dem chromosomales *dgcE* 3xFLAG-markiert vorliegt.

Die Überexpression von plasmidkodiertem DgcE wirkte sich stark auf den Abbau von chromosomal kodiertem $\text{DgcE}::3\text{xFLAG}$ aus. Je mehr DgcE exprimiert wurde (vgl. +/- IPTG-Zugabe), desto stärker akkumulierte auch $\text{DgcE}::3\text{xFLAG}$, was anhand von schwächeren Abbaubanden und einer großen Aggregationsbande ersichtlich wurde (Abb. 14).

Anhand der Expressionsanalyse von plasmidkodiertem DgcE wurde deutlich, dass (i) der Prozessierung von DgcE mittels DgcE-Überexpression entgegengewirkt werden kann (Abb. 14), was darauf schließen lässt, dass dabei eine bzw. mehrere Proteasen austitriert werden. (ii) Die inhibitorische EAL_{deg} -Domäne wirkt der Oligomerisierung von DgcE entgegen (vgl. Abb. 13, $\Delta\text{EAL}::6\text{His}$ & 10B $\Delta\text{EAL}::3\text{xFLAG}$ üN), was wiederum nahe legt, dass (iii) aktives DgcE als Oligomer vorliegen könnte.

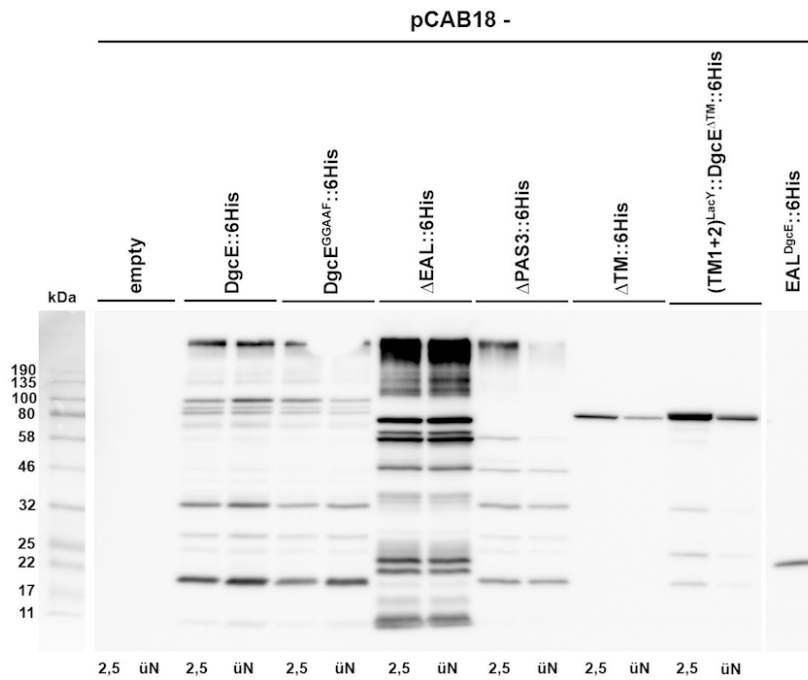


Abb. 13: Expression und Proteolysemuster sämtlicher plasmidkodierter DgcE-Varianten. Die Immunoblotdetektion unterschiedlicher pCAB18-kodierter 6His-markierter DgcE-Varianten sowie der einzelnen degenerierten EAL-Domäne im W3110-Stammhintergrund erfolgte nach Wachstum in Flüssigmedium (LB/Amp) bei 28 °C. Probennahmen erfolgten bei einer $OD_{578} = 2,5$ und nach 24 h (üN). Die Detektion erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-6His-Antikörpers. Sichtbar sind lediglich solche Fragmente, die den C-terminalen 6His-tag beinhalten. Die Proben samt Marker wurden auf dasselbe Gel geladen. Ein Bereich zwischen Marker und den Proben sowie zwischen $(TM1+2)^{LacY}::DgcE^{\Delta TM}::6His$ und $EAL^{DgcE}::6His$ wurde entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden.

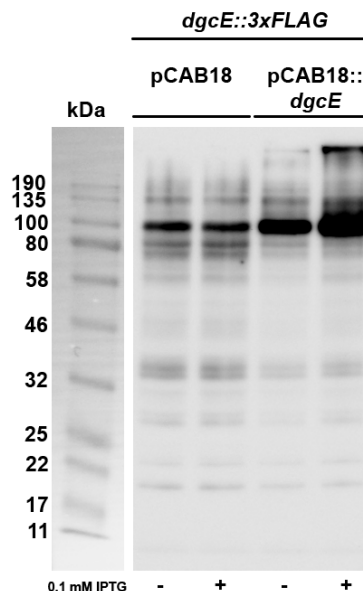


Abb. 14: Überexpression von DgcE resultiert in verminderter Prozessierung des DgcE-Proteins. Immunoblotdetektion von chromosomal kodiertem DgcE::3xFLAG bei *in trans* Überexpression von pCAB18-kodiertem DgcE erfolgte nach 24 h Wachstum in Flüssigmedium (LB/Amp) bei 28 °C. Die Kulturen wurden auf eine Start- $OD_{578} = 0,05$ angeimpft. Nach 2 h Wachstum erfolgte bei den gekennzeichneten Kulturen die Zugabe von 0,1 mM IPTG (+), bevor die Kulturen weiter inkubiert wurden. Die Detektion erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers. Sichtbar sind lediglich solche Fragmente, die den C-terminalen 3xFLAG-tag beinhalten. Die Proben samt Marker wurden auf dasselbe Gel geladen. Ein Bereich zwischen Marker und den Proben wurde entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden.

4.1.2.4 Analyse von potentiellen an der DgcE-Proteolyse beteiligten Proteasen

Da der massive Abbau von DgcE von dem Vorhandensein der DgcE-eigenen Transmembrandomänen abhängig war und vom N-Terminus her erfolgte (4.1.2.1 - 4.1.2.3), rückten v. a. membranständige Proteasen als potentielle an der DgcE-Proteolyse beteiligte Kandidaten in den Fokus. Hierbei wurde zwischen mindestens zwei proteolytischen Ereignissen unterschieden. Zum einen fand der konstitutive Abbau von DgcE statt, der in sämtlichen Wachstumsphasen zu beobachten war, und zum anderen die gesonderte Prozessierung der degenerierten EAL-Domäne, die in der Stationärphase zuzunehmen schien (Abb. 9) und lediglich der Membranständigkeit von DgcE bedurfte ohne den Einfluss der DgcE-eigenen Transmembrandomänen (siehe TM1+2^{LacY}::DgcE^{ΔTM} in Abb. 10). Im weiteren Verlauf sollten nun solche Proteine identifiziert werden, die an der Proteolyse von DgcE beteiligt sind.

Wahrscheinlich erscheinende Kandidaten waren v. a. solche, die in der inneren Zellmembran lokalisiert sind. Dazu gehören FtsH (ATP-abhängige Zink-Metalloprotease) mit seinem Regulatorkomplex HflKC, GlpG (Serinprotease), HtpX (Zink-abhängige Endoprotease), QmcA (Supressor einer *ftsH/htpX*-Deletionsmutante) und RseP (site-2 Protease). Desweiteren wurden ATP-abhängige cytoplasmatische Proteasen in Betracht gezogen, wozu ClpX/A/P, Lon (Serinprotease), YcbZ (mutmaßliches Lon-Homolog) und HslVU (Proteasekomplex) gehören (Chiba et al., 2006; Dalbey et al., 2012; Olivares et al., 2016). Da RseP essentiell für das bakterielle Wachstum ist (Dartigalongue et al., 2001), wurde dieses Protein im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht weiter untersucht. Um die oben beschriebenen Prozessierungsereignisse getrennt voneinander untersuchen zu können, wurde die Auswirkung von Proteasedeletionen auf die Proteolyse von DgcE::3xFLAG und TM1+2^{LacY}::DgcE^{ΔTM}::3xFLAG analysiert.

Anhand von Abb. 15 wird ersichtlich, dass keiner der untersuchten Proteasekandidaten an der Prozessierung von DgcE beteiligt ist, da das Proteolysemuster von DgcE::3xFLAG durch keine der Proteasedeletionen beeinträchtigt wurde. Auch die EAL_{deg}-Abbaubande von TM1+2^{LacY}::DgcE^{ΔTM}::3xFLAG blieb unter sämtlichen Bedingungen bestehen. Lediglich erhöhte DgcE-Proteinmengen in $\Delta clpX/P$ -Mutanten waren augenfällig. Dies ist jedoch wahrscheinlich auf erhöhte DgcE-Mengen aufgrund fehlender RpoS(σ^S)-Proteolyse durch ClpXP zurückzuführen (*dgcE*-Expression unterliegt RpoS-Kontrolle).

Die Deletion von *ftsH* ist für sich alleine letal, aber durch eine zusätzliche Supressormutation (*sfhC21*) sind Bakterien lebensfähig (Tatsuta et al., 1998). Für die nähere Untersuchung der Beteiligung von FtsH an der DgcE-Proteolyse wurden zwei W3110-Derivate aus dem Labor von Prof. Narberhaus (Ruhr-Universität, Bochum) verwendet, wobei einer als Kontrollstamm

lediglich die Supressormutation *sfhC21* aufweist und der andere zusätzlich eine Deletion von *ftsH*. In diesen Stämmen wurde DgcE::6His mithilfe von pCAB18 exprimiert und mittels Westernblotanalyse detektiert (Abb. 16A).

Das DgcE-Degradationsmuster in einer *ftsH*-Deletionsmutante unterschied sich nicht von dem im Kontrollstamm, was vermuten ließ, dass auch FtsH nicht an der DgcE-Proteolyse beteiligt ist. Der Kontrollstamm wies allerdings bereits ein leicht vom W3110-Stamm unterschiedliches Proteolysemuster auf und bildete flache weißliche Makrokolonien aus, was auf stark verminderte Biofilmmatrixproduktion schließen lässt. Da sich demnach bereits der Kontrollstamm deutlich anders verhielt als der W3110-Stamm, war die Vergleichbarkeit kaum gegeben, sodass nicht gesichert festgestellt werden konnte, ob FtsH an der DgcE-Proteolyse beteiligt ist oder nicht (vgl. Diskussion 5.2).

Schließlich wurde die cytosolische Peptidase YhjJ für Protease-Identifikationsstudien herangezogen sowie zwei periplasmatische Proteasen - PtrA und PqqL. Die Deletion dieser drei Proteasen wirkte sich ebenfalls nicht auf das Proteolysemuster von DgcE::3xFLAG aus (Abb. 16B).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte keine Protease identifiziert werden, die an dem kontinuierlichen Abbau von DgcE beteiligt ist. Entweder erfolgt die Proteolyse durch eine oder mehrere bislang nicht getestete/r Protease/n (z. B. RseP), oder aber mehrere Proteasen wirken redundant, sodass die Deletion einer einzigen Protease nicht ausreichend für die Stabilisierung von DgcE ist (vgl. Diskussion 5.2).

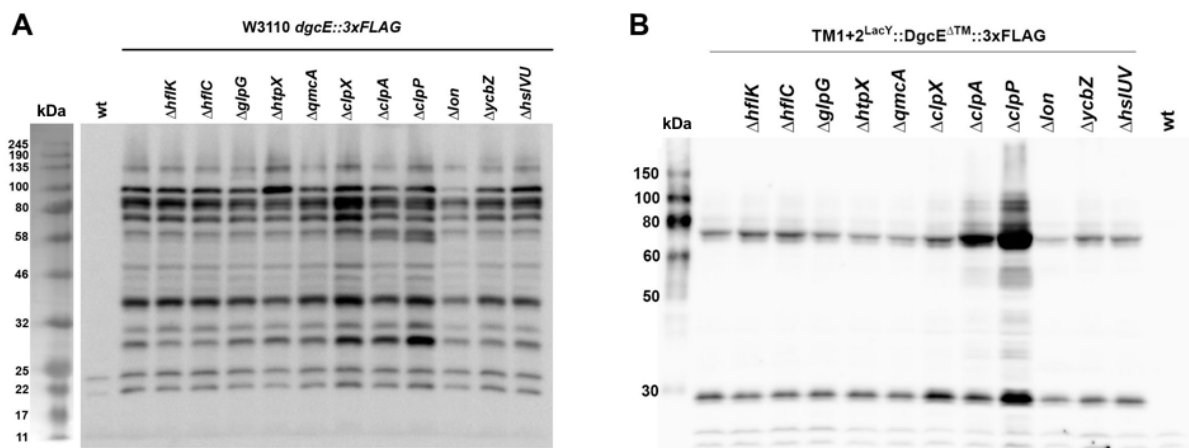


Abb. 15: Analyse von potentiellen an der DgcE-Proteolyse beteiligten Proteinen. Immunoblotdetektion von chromosomal kodiertem (A) DgcE::3xFLAG und (B) TM1+2^{LacY}::DgcE^{ΔTM}::3xFLAG in verschiedenen Deletionsmutanten erfolgte nach 24 h Wachstum in Flüssigmedium (LB) bei 28 °C. Als Kontrolle diente stets ein W3110-Stamm ohne 3xFLAG-markiertem Gen (wt). Die Detektion der 3xFLAG-markierten DgcE-Varianten erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers. Ein Bereich zwischen Marker und den Proben in (A) wurde entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden.

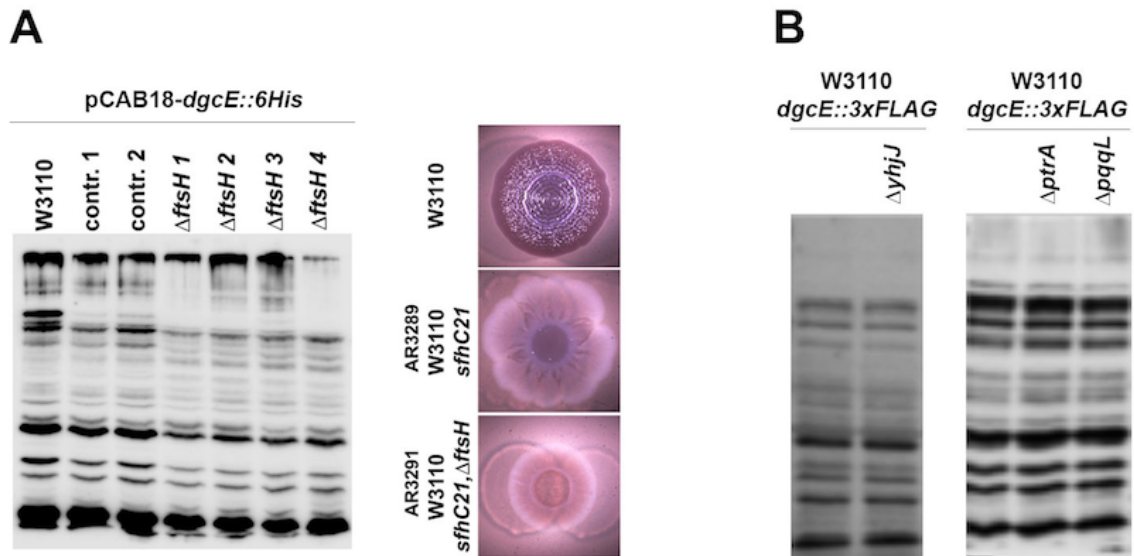


Abb. 16: Analyse der Beteiligung von FtsH, YhjJ, PtrA und PqqL an der DgcE-Proteolyse. (A) Immunoblotdetektion von pCAB18-kodiertem DgcE::6His in W3110 sowie in mehreren Klonen von W3110 *sfhC21* (contr.) und W3110 *sfhC21* Δ *ftsH* (Δ *ftsH*) erfolgte nach 24 h Wachstum in Flüssigmedium (LB/Amp) bei 28 °C. Die Detektion erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-6His-Antikörpers. Makrokolonien von W3110 und Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. **(B)** Immunoblotdetektion von chromosomal kodiertem DgcE::3xFLAG in verschiedenen Deletionsmutanten erfolgte nach 24 h Wachstum in Flüssigmedium (LB) bei 28 °C. Die Detektion erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers.

4.1.3 Regulation der DgcE-Aktivität durch YjdA und YjcZ

Die bedeutende Rolle, die DgcE für die Biofilmbildung von *E. coli* K12 einnimmt sowie dessen strukturelle Komplexität bieten vielfache Angriffspunkte für eine multiple Signalintegration und Regulation. Vorangegangene Studien rückten mindestens zwei Proteine in den Fokus, die hierbei einen entscheidenden Einfluss haben könnten – YjdA und YjcZ. Durch eine die bakterielle Motilität betreffende Arbeit ist bekannt, dass der Motilitätsdefekt einer *pdeH*-Deletionsmutante nicht nur durch eine zusätzliche Deletion von *dgcE* teilweise kompensiert werden kann, sondern in gleichem Maße auch durch die zusätzliche Deletion von *yjdA* und *yjcZ* (Girgis et al., 2007). Neben DgcE scheinen demnach auch diese beiden Proteine an der Regulation von Motilität und gegebenenfalls auch an der Biofilmbildung beteiligt zu sein.

Die Gene *yjdA* und *yjcZ* liegen im selben Operon, welches unter flagellarer Kontrolle (σ^{28}) exprimiert wird. Während die Funktion von YjcZ - das kleinere dieser beiden Proteine - bisher unbekannt ist, ist YjdA als ein oligomerisierendes bakterielles Dynamin-ähnliches Protein (BDLP) definiert, welches eine für Dynamine charakteristische GTPase-Sequenz aufweist (Ozaki et al., 2013; van der Blik, 1999). Im Gegensatz zu anderen BDLPs ist YjdA jedoch nicht mit einer membranbindenden Struktur ausgestattet (vgl. 1.3.2). Diese Besonderheit sowie die potentielle Beteiligung an c-di-GMP-vermittelter Signaltransduktion auf Ebene von

DgcE machten YjdA und YjcZ zu interessanten Forschungsobjekten. Ihr Einfluss auf die DgcE-Aktivität soll in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet werden.

4.1.3.1 DgcE-vermittelte Matrixsynthese erfordert YjdA und YjcZ

Zunächst wurden *yjdA*- und *yjcZ*-Deletionen in dem pEtN-Cellulose- und Curli-produzierenden Stamm AR3110 generiert, um deren Auswirkungen mit der einer *dgcE*-Deletion vergleichen zu können (Abb. 17).

Die Deletion eines oder beider flagellarer Gene ($\Delta yjdA$, $\Delta yjcZ$, $\Delta yjdA-yjcZ$) resultierte in dem gleichen reduzierten Makrokolonie-Phänotyp, den eine $\Delta dgcE$ -Mutante zeigte. Diese phänotypische Ausprägung änderte sich auch bei einer zusätzlichen Deletion von *dgcE* nicht ($\Delta yjdA\Delta dgcE$, $\Delta yjcZ\Delta dgcE$, $\Delta yjdA-yjcZ\Delta dgcE$). Zudem konnte eine *pdeH*-Deletionsmutante durch zusätzliche Deletionen von *yjdA* und *yjcZ* in gleichem Maße kompensiert werden wie durch eine *dgcE*-Deletion, wohingegen Deletionen in einer *pdeR*-Deletionsmutante keine Auswirkungen hatten. Folglich agieren YjdA und YjcZ an gleicher Position der Biofilmmatrix-Kontrollkaskade wie DgcE (Abb. 17A, vgl. auch Abb. 7A).

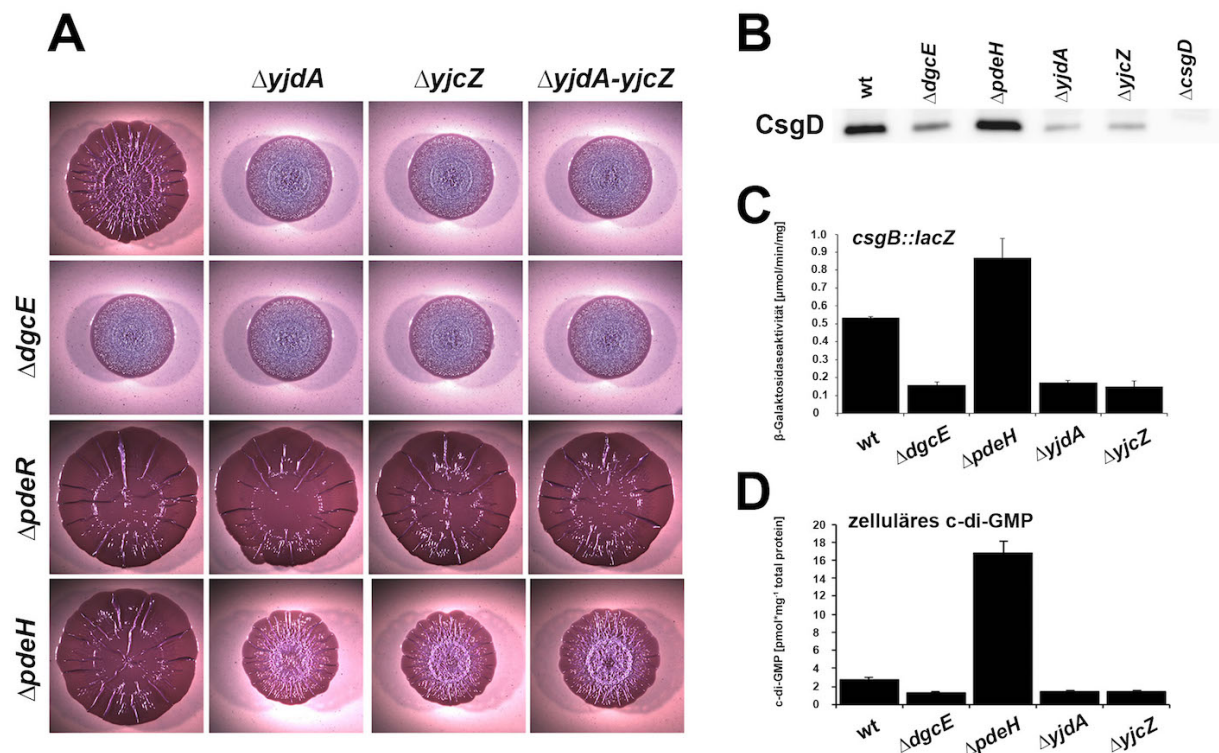


Abb. 17: YjdA und YjcZ beeinflussen c-di-GMP-vermittelte Biofilmmatrixproduktion über DgcE. (A) Makrokolonien von AR3110 (oben links) sowie Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. (B) Immunoblotdetektion von CsgD in AR3110 und Derivaten nach Wachstum in LB bei 28 °C bis zu einer OD₅₇₈ = 3,7. 6 μ g Gesamtprotein wurden in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mithilfe eines CsgD-spezifischen Antikörpers detektiert. (C) Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion in W3110 $\Delta lac(I-A)$ (wt) und Derivaten nach 24 h Wachstum in LB bei 28 °C. Die Daten resultieren aus Triplikaten. (D) Zelluläre c-di-GMP-Konzentrationen wurden aus W3110 (wt) und Derivaten ermittelt nach Wachstum in LB bei 28 °C bis zu einer OD₅₇₈ = 3. Die Daten resultieren aus Triplikaten.

Anhand von zellulären CsgD-Proteinmengen mittels Immunoblotdetektion und der Expression einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion in Stationärphase-Zellen wurde weiterhin bestätigt, dass die Matrixproduktion in den $\Delta yjdA$ -, $\Delta yjcZ$ - und $\Delta dgcE$ -Stämmen gleichermaßen stark reduziert war, wohingegen eine $\Delta pdeH$ -Mutation in erhöhter Expression resultierte (Abb. 17B & C).

Die Messung der zellulären Konzentrationen von c-di-GMP ergab, dass diese in den drei Deletionsmutanten $\Delta dgcE$, $\Delta yjdA$ und $\Delta yjcZ$ auf etwa die Hälfte reduziert war, was auf fehlende oder verminderte Zyklaseaktivität von DgcE schließen ließ. Die Deletion von *pdeH* hingegen zeigte eine drastisch erhöhte c-di-GMP-Konzentration aufgrund fehlender PDE-Aktivität (Abb. 17D).

Anhand dieser Daten wird deutlich, dass Deletionen von *yjdA* und *yjcZ* stets in der gleichen phänotypischen Ausprägung resultieren wie eine Deletion von *dgcE* und dabei ebenfalls die zelluläre c-di-GMP-Konzentration beeinflussen. YjdA und YjcZ greifen folglich in die c-di-GMP-vermittelte *csgD*- und *csgB*-Expression ein und wirken dabei aktivierend auf Ebene von DgcE.

4.1.3.2 YjdA und YjcZ wirken weder auf die Proteolyse noch auf die inhibitorische EAL_{deg}-Domäne von DgcE ein

Das Wissen um eine aktivierende Wirkung seitens YjdA und YjcZ (4.1.3.1) und den inhibierenden Einfluss der degenerierten EAL-Domäne (EAL_{deg}) auf die Aktivität von DgcE (4.1.1.2) bot Raum für die Hypothese, dass die aktivierende Wirkungsweise von YjdA und YjcZ möglicherweise darin besteht, dem inhibierenden Effekt der EAL_{deg}-Domäne entgegenzuwirken. Wäre dies der Fall, dann würden Deletionen von *yjdA* und *yjcZ* in einer *dgcE* ^{Δ EAL}-Mutante keine Auswirkungen zeigen, weil deren Wirkungsziel (die EAL_{deg}-Domäne) in einem solch modifizierten Stamm nicht mehr vorhanden wäre.

Die Analyse von Makrokolonien widerlegte diese Hypothese jedoch. Der Phänotyp der *dgcE* ^{Δ EAL}-Mutante, der aufgrund erhöhter Matrixproduktion sehr rot, groß und flach mit hohen Stegen war, blieb bei der zusätzlichen Deletion von *yjdA* und *yjcZ* nicht erhalten. Vielmehr führten solche Deletionen zu reduzierteren Phänotypen, was anhand kleinerer Kolonien, die vielfältige Fältchen produzierten, sichtbar wurde (Abb. 18A).

Die ständige massive Proteolyse von DgcE könnte Ziel regulatorischer Prozesse sein, wobei daran beteiligte Proteasen in dieser Arbeit nicht ausgemacht werden konnten (4.1.2). Eine regulatorische Beteiligung von YjdA und YjcZ an eben diesem Prozess schien möglich, weshalb der Abbau von chromosomal kodiertem DgcE::3xFLAG bei Abwesenheit von *yjdA* und *yjcZ* verfolgt wurde (Abb. 18B).

Das Proteolysemuster unterschied sich nicht von dem des wildtypischen Stammhintergrundes (Abb. 18B), sodass eine Beteiligung von YjdA und YjcZ an der DgcE-Proteolyse auszuschließen war.

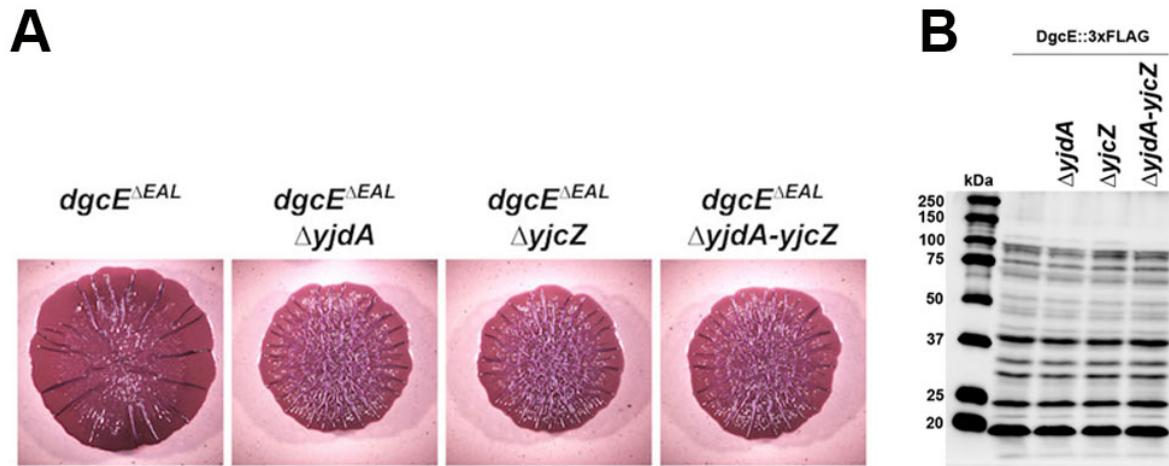


Abb. 18: YjdA und YjcZ wirken weder auf die EAL_{deg}-Domäne noch die Proteolyse von DgcE ein. (A) Makrokolonien von AR3110 *dgcE*^{ΔEAL} und Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. (B) Immunoblotdetektion von chromosomal kodiertem DgcE::3xFLAG in *yjdA*- und *yjcZ*-Deletionsmutanten erfolgte nach 24 h Wachstum in Flüssigmedium (LB) bei 28 °C. Die Detektion erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers.

4.1.3.3 DgcE, YjdA und YjcZ bilden einen Proteinkomplex

YjdA und YjcZ beeinflussen weder die Proteolyse von DgcE noch den inhibitorischen Effekt seiner EAL_{deg}-Domäne (4.1.3.2). Um die Art und Weise der Aktivitätsregulation von DgcE durch YjdA und YjcZ klären zu können, wurde anhand von Bacterial-Two-Hybrid(BTH)-Studien (Karimova et al., 1998) untersucht, ob eine direkte physische Interaktion dieser drei Proteine besteht.

Wie bereits in 4.1.1.3 erläutert, war eine Dimerisierung von DgcE lediglich dann zu beobachten, wenn die CyaA-Untereinheiten T25 bzw. T18 an den C-Terminus von DgcE fusioniert waren. N-terminale Fusionen hingegen resultierten in weißen Kolonien. Aufgrund dessen wurden Interaktionen zwischen DgcE und YjdA bzw. YjcZ anhand von pKNT25- bzw. pUT18-kodierten Fusionsproteinen analysiert, wobei die CyaA-Untereinheiten an die C-Termini der Proteine fusioniert waren (DgcE-T25/18, YjdA-T25/18, YjcZ-T25/18).

Neben der Dimerisierung von DgcE-T25/18 wurde auch eine starke Dimerisierung von YjdA-T25/18 sichtbar (Abb. 19). Dies war erwartungsgemäß und bestätigte die zuvor beschriebene Oligomerisierung von YjdA (Ozaki et al., 2013). Eine klare Interaktion war zudem zwischen DgcE-T25/18 und YjdA-T25/18 zu beobachten (Abb. 19). Diese Interaktion kam nicht mit T25/18-DgcE zustande und bestärkte die Annahme, dass DgcE mit N-terminal

fusioniertem CyaA-Fragment für diese Interaktionsstudien nicht geeignet ist. YjcZ-T25/18 und T25/18-YjcZ zeigten weder Dimerisierung noch eine Interaktion mit DgcE-T25/18, was anhand weißer Kolonien sichtbar wurde (Abb. 19, exemplarisch dargestellt sind Interaktionsstudien mit YjcZ-T25/18). Es bestand jedoch eine starke Interaktion zwischen YjcZ und YjdA, wobei die CyaA-Fragmente hier am N-Terminus beider Proteine fusioniert vorlagen (T25/18-YjcZ, T25/18-YjdA, Abb. 19).

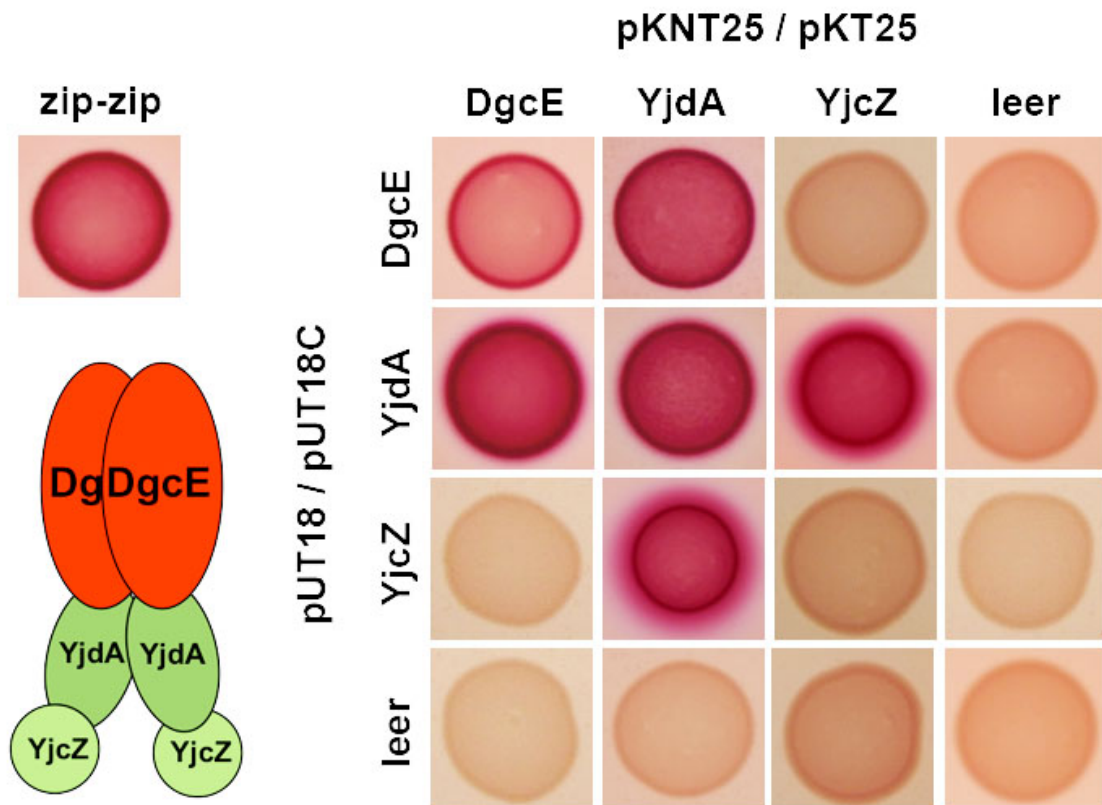


Abb. 19: DgcE, YjdA und YjcZ formen einen Proteinkomplex. *In vivo* Protein-Protein-Interaktionsstudien nach Karimova et al (1998) wurden mit DgcE, YjdA und YjcZ durchgeführt. Interaktionsstudien, die DgcE beinhaltenen sowie die Dimerisierung von YjdA und YjcZ untersuchten, wurden mit Fusionsproteinen durchgeführt, die am C-Terminus die CyaA-Untereinheiten T25 bzw. T18 aufwiesen und von pKNT25 bzw. pUT18 exprimiert wurden. Die Interaktion zwischen YjdA und YjcZ wurde mit Fusionsproteinen durchgeführt, die am N-Terminus die CyaA-Untereinheiten T25 bzw. T18 aufwiesen und von pKT25 bzw. pUT18C exprimiert wurden. pKNT25- und pUT18-Derivate bzw. pKT25 und pUT18C-Derivate wurden in W3110 $\Delta cyaA$ co-exprimiert, resultierende Transformanten in H_2O resuspendiert und 5 μl der Suspension auf MacConkey-Platten (+1 % Maltose, + Amp, + Kan) bei 28 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte nach 1 d. Bei einer Interaktion wird die CyaA-Aktivität wiederhergestellt, was die Verwertung von Maltose ermöglicht und aufgrund der Ansäuerung zu einer Rotfärbung führt. Die Interaktion des Leucin-Zippers des Hefeproteins GCN4 (zip-zip) diente als Positivkontrolle, Ansätze mit Leerplasmiden (leer) als Negativkontrollen. Die hier gezeigten Negativkontrollen beinhalten pKNT25 und pUT18. Sowohl DgcE als auch YjdA dimerisieren und interagieren zudem miteinander. YjcZ interagiert nicht direkt mit DgcE, ist jedoch durch eine Interaktion mit YjdA am Komplex beteiligt.

Um sicherzustellen, dass YjdA und DgcE tatsächlich gleichzeitig in der Zelle vorliegen und physischen Kontakt aufnehmen können, wurde chromosomales *yjdA* mit einem C-terminalen 3xFLAG-tag markiert. Die Expression von YjdA-Protein wurde daraufhin mittels Immunoblotdetektion über den Wachstumsverlauf verfolgt und mit der von DgcE verglichen. Eine der YjdA::3xFLAG entsprechende Bande von ca. 87 kDa war in sämtlichen Wachstumsphasen detektierbar und am stärksten in der postexponentiellen Phase sowie beim Übergang in die Stationärphase vertreten (Abb. 20).

Somit liegen YjdA und DgcE, welches ebenfalls vornehmlich in der stationären Wachstumsphase exprimiert wird (vgl. Abb. 9B), gemeinsam in der Zelle vor, was eine physische Interaktion erlaubt.

Diese Daten zeigen, dass eine Komplexbildung aus DgcE, YjdA und YjcZ stattfindet, wobei DgcE und YjdA dimerisieren (oder sogar oligomerisieren) und zudem miteinander interagieren. YjcZ interagiert nicht direkt mit DgcE, ist jedoch durch eine Interaktion mit YjdA am Komplex beteiligt.

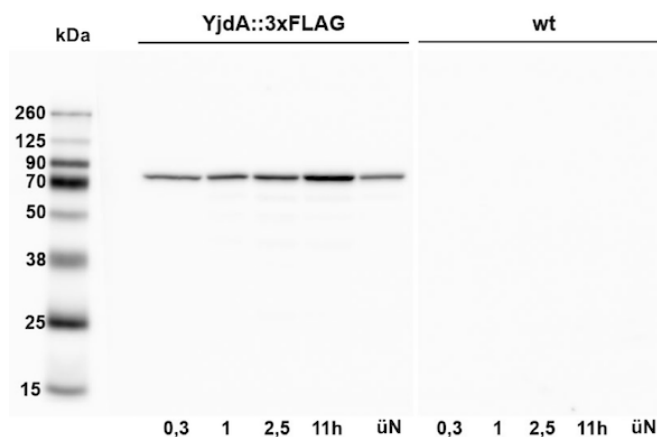


Abb. 20: YjdA ist in sämtlichen Wachstumsphasen in der Zelle vorhanden. Immunoblot zur Detektion von YjdA::3xFLAG (~ 87 kDa) in unterschiedlichen Wachstumsphasen mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers. Das Wachstum eines W3110 *yjdA::3xFLAG* Stammes und eines W3110 Stammes ohne 3xFLAG-markiertes Gen (wt) als Kontrolle erfolgte in LB bei 28 °C. Proben wurden bei einer $OD_{578} = 0,3$, 1 und 2,5 genommen sowie nach 11 h und 24 h (üN) Wachstum. Die Proben samt Marker wurden auf dasselbe Gel geladen. Ein Bereich zwischen YjdA::3xFLAG und wt wurde entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden.

4.1.3.4 YjdA interagiert mit der TM-Region von DgcE

Mittels Bacterial-Two-Hybrid(BTH)-Studien (Karimova et al., 1998) sollte aufgedeckt werden, mit welchem DgcE-Proteinanteil YjdA interagiert. Das Fusionsprotein YjdA-T18 (exprimiert von pUT18) wurde daraufhin auf Interaktionsereignisse mit verschiedenen DgcE-Varianten, die ein C-terminales T25-Fragment aufwiesen und von pKNT25 exprimiert wurden, getestet.

Abb. 21 verdeutlicht, dass eine Interaktion mit DgcE-Varianten, denen die drei PAS-Domänen, die GGDEF- oder EAL_{deg}-Domäne fehlen (Δ PAS3-T25, Δ GGDEF-T25, Δ EAL-T25), möglich war. Mit einer löslichen DgcE-Variante (Δ TM-T25) hingegen zeigte YjdA-T18 nach 1 d keinerlei Interaktion.

Folglich interagiert YjdA mit DgcE über dessen Transmembrandomänen (TM). Dies deutet zudem darauf hin, dass die Komplexbildung aus DgcE, YjdA und YjcZ (vgl. Abb. 19) an der inneren Zellmembran stattfindet.

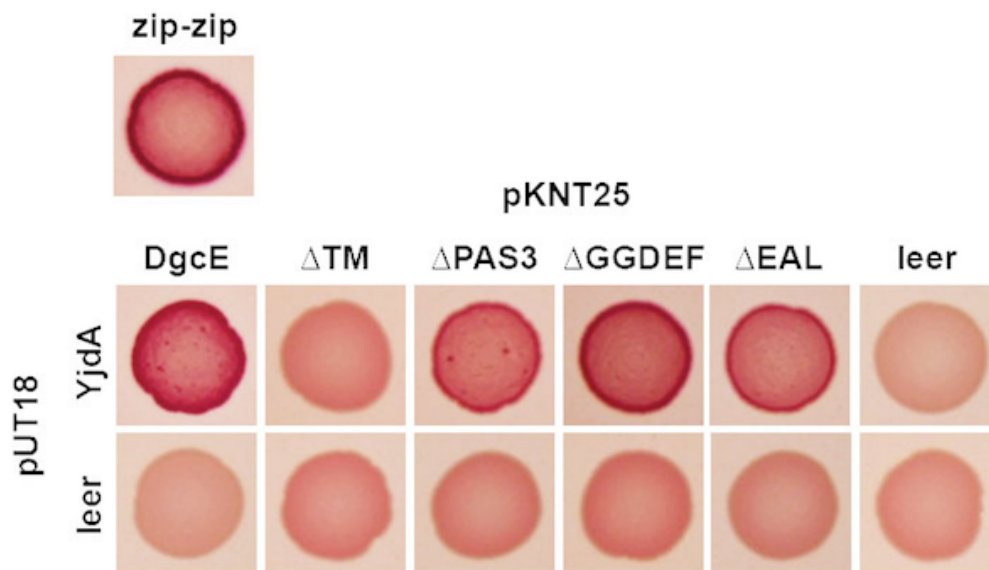


Abb. 21: YjdA interagiert mit der TM-Region von DgcE. *In vivo* Protein-Protein-Interaktionsstudien nach Karimova *et al.* (1998) wurden mit YjdA und verschiedenen DgcE-Varianten durchgeführt. Ein Δ bezeichnet die Abwesenheit der entsprechenden Domäne innerhalb von DgcE. Als TM sind die zehn Transmembrandomänen und als PAS3 alle drei aufeinanderfolgenden PAS-Domänen bezeichnet. Fusionsproteine (T25 bzw. T18 am C-Terminus des zu testenden Proteins) wurden von pKNT25 und pUT18 in W3110 Δ cyaA co-exprimiert, resultierende Transformanten in H₂O resuspendiert und 5 μ l der Suspension auf MacConkey-Platten (+1 % Maltose, + Amp, + Kan) bei 28 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte nach 1 d. Bei einer Interaktion wird die CyaA-Aktivität wiederhergestellt, was die Verwertung von Maltose ermöglicht und aufgrund der Ansäuerung zu einer Rotfärbung führt. Die Interaktion des Leucin-Zippers des Hefeproteins GCN4 (zip-zip) diente als Positivkontrolle, Ansätze mit Leerplasmiden (leer) als Negativkontrollen.

4.1.3.5 GTPase-Aktivität von YjdA ist notwendig für die Matrixsynthese und Komplexbildung mit DgcE

YjdA und YjcZ haben einen aktivierenden Einfluss auf DgcE und somit die CsgD-vermittelte Matrixsynthese. Da YjdA mit der Transmembranregion von DgcE interagiert (vgl. Abb. 21), ist anzunehmen, dass die aktivierende Wirkung von YjdA und YjcZ über die Transmembrandomänen von DgcE vermittelt wird, was wiederum die Notwendigkeit dieser Region für die DgcE-Aktivität untermauert.

Nicht außer Acht gelassen werden sollte auch die N-terminale GTPase-Domäne von YjdA, die ebenfalls einen regulatorischen Einfluss ausüben könnte. Innerhalb des G2-Motivs der GTPase-Domäne weist YjdA ein konserviertes Threonin auf (T103), das für eukaryotisches Dynamin (T65) bereits vielfach untersucht wurde. Es ist im aktiven Zentrum lokalisiert und an der Katalyse von GTP beteiligt (Chappie et al., 2010). Für die Dynamin-Mutante T65D wurde eine erhöhte GTP-Affinität sowie verminderte GTP-Katalyse beschrieben (Song et al., 2004). Um den Einfluss der GTPase-Aktivität von YjdA auf die Matrixsynthese unter physiologischen Bedingungen verfolgen zu können, wurde eine *yjdA*^{T103D}-Mutation im Chromosom von AR3110 erzeugt. Eine solche Mutante sollte hauptsächlich in der GTP-gebundenen Form vorliegen und in seiner katalytischen Funktion gestört sein.

Zunächst sollte überprüft werden, ob sich der Aminosäureaustausch innerhalb von YjdA (T103D) auf die Proteinexpression auswirkt. Zu diesem Zweck wurde ein C-terminaler 3xFLAG-tag an chromosomales *yjdA*^{T103D} fusioniert und die exprimierten Proteinmengen entlang der Wachstumskurve mithilfe eines 3xFLAG-Antikörpers analysiert.

Die detektierten Proteinmengen von YjdA::3xFLAG und YjdA^{T103D}::3xFLAG (~87 kDa) waren gleich. Die *yjdA*^{T103D}::3xFLAG-Mutante erzeugte verglichen mit einer *yjdA*::3xFLAG-Mutante und dem Wildtyp W3110 dennoch eine deutlich reduzierte Makrokolonie (Abb. 22).

Die im Folgenden beschriebenen Auswirkungen einer *yjdA*^{T103D}-Mutation sind also nicht auf verminderte Expression zurückzuführen.

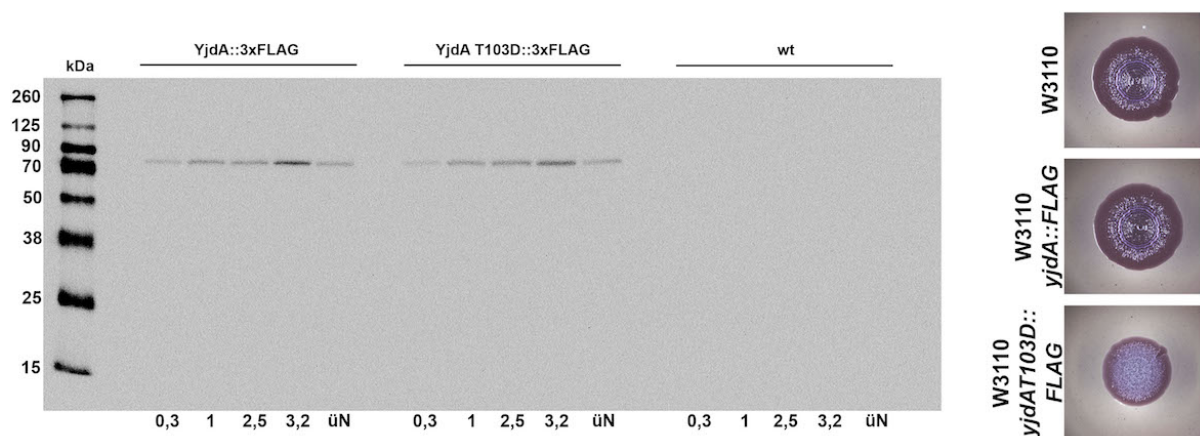


Abb. 22: Die Expression von GTPase-defizientem YjdA^{T103D} ist nicht verändert. Immunoblot zur Detektion von YjdA::3xFLAG sowie von GTPase-defizientem YjdA T103D::3xFLAG (~87 kDa) in unterschiedlichen Wachstumsphasen mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers. Das Wachstum der W3110-Derivate und eines W3110-Stammes ohne 3xFLAG-markiertem Gen (wt) als Kontrolle erfolgte in LB bei 28 °C. Proben wurden bei einer OD₅₇₈ = 0,3 , 1 , 2,5 , 3,2 und nach 24 h (üN) Wachstum entnommen. Makrokolonien der gleichen Stämme wurden durch das Tropfen von 5 µl Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt.

Die Expression extrazellulärer Matrixsubstanzen einer *yjdA*^{T103D}-Mutante war auch im AR3110-Hintergrund deutlich vermindert und glich der einer *yjdA*-Deletionsmutante. Deutlich wurde dies anhand einer im Vergleich zum Wildtypen stark reduzierten Makrokoloniestruktur (Abb. 23A) sowie verminderten CsgD-Proteinmengen und einer schwächeren *csgB*::lacZ-

Reportergenexpression in der Stationärphase (Abb. 23B & C). Eine chromosomale Deletion des *yjdA-yjcZ*-Operons konnte zudem nicht durch plasmidkodiertes YjdA^{T103D}-YjcZ komplementiert werden, wohingegen pCAB18-kodiertes YjdA-YjcZ zu einer vollständigen Wiederherstellung des wildtypischen Phänotyps in der Lage war (Abb. 23D).

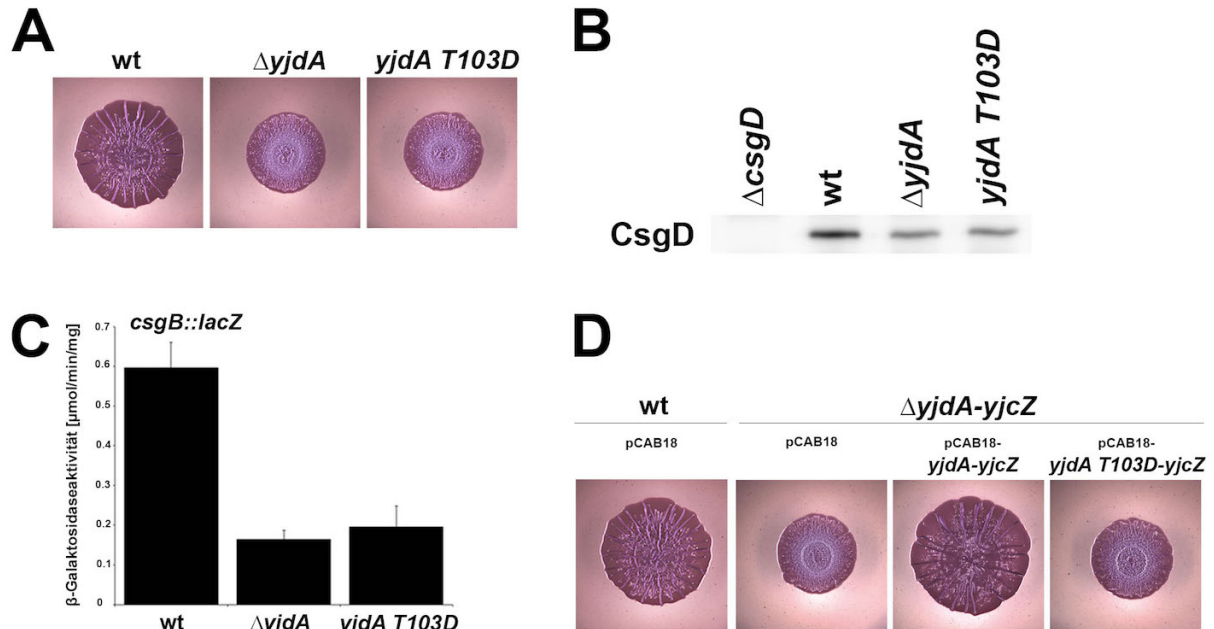


Abb. 23: Die GTPase-Aktivität von YjdA ist essentiell für die Expression der Biofilmmatrix. Die Mutante *yjdA*^{T103D} sollte aufgrund eines Aminosäureaustausches innerhalb des G2-Motivs eine erhöhte GTP-Affinität aufweisen und in ihrer katalytischen GTPase-Funktion gestört sein. Diese Mutante wurde auf ihre biofilmbildenden Eigenschaften hin untersucht. **(A)** Makrokolonien von AR3110 (*wt*) und Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. **(B)** Immunoblotdetektion von CsgD aus in (A) verwendeten Stämmen erfolgte nach Wachstum in LB bei 28 °C bis zu einer OD₅₇₈ = 3,7. 6 μ g Gesamtprotein wurden in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mithilfe eines CsgD-spezifischen Antikörpers detektiert. **(C)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion in W3110 Δ *lacI-A* (*wt*) und Derivaten nach 24 h Wachstum in LB bei 28 °C. Die Daten resultieren aus Triplikaten. **(D)** Nach der Transformation von AR3110 und AR3110 $\Delta yjdA-yjcZ$ mit pCAB18 und pCAB18-Derivaten wurden Makrokolonien durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten (+ Amp) und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt.

Es wurde deutlich, dass die GTPase-Aktivität von YjdA eine entscheidende Rolle für die Synthese extrazellulärer Matrixsubstanzen spielt und somit notwendig für seine aktivierende Wirkung auf DgcE-vermittelte *csgD*-Expression ist. Dieser Befund warf die Frage auf, ob die permanente GTP-Bindung ohne GTP-Hydrolyse von YjdA^{T103D} zu Interaktionsproblemen führt, wodurch die Komplexbildung aus DgcE, YjdA und YjcZ gestört wäre. BTH-Studien sollten diesbezüglich Aufschluss geben, wobei zwecks Vergleichbarkeit die Fusion der CyaA-Untereinheiten T25 und T18 wie in Kapitel 4.1.3.3 gewählt wurde. Die Interaktionsanalyse der YjdA-Varianten mit sich selbst sowie mit DgcE erfolgte mittels C-terminal fusioniertem T25 bzw. T18. Die Interaktion zwischen YjdA-Varianten und YjcZ hingegen wurde mit N-terminalen Fusionen durchgeführt (Abb. 24).

Während YjdA bekanntermaßen oligomerisiert, zeigte YjdA^{T103D}-T25/18 nach 1 d eine deutlich schwächere Rotfärbung und somit eine stark verringerte Interaktion mit sich selbst.

Ähnliches war bezüglich der Interaktion mit DgcE zu verzeichnen. Während DgcE-T25/18 mit YjdA-T25/18 sehr stark interagierte, war YjdA^{T103D}-T25/18 nach 1 d zu keinerlei Interaktion fähig, was anhand von weißen Kolonien sichtbar wurde. Die Interaktion mit YjcZ hingegen war in der GTPase-defizienten YjdA-Variante nicht beeinträchtigt (Abb. 24).

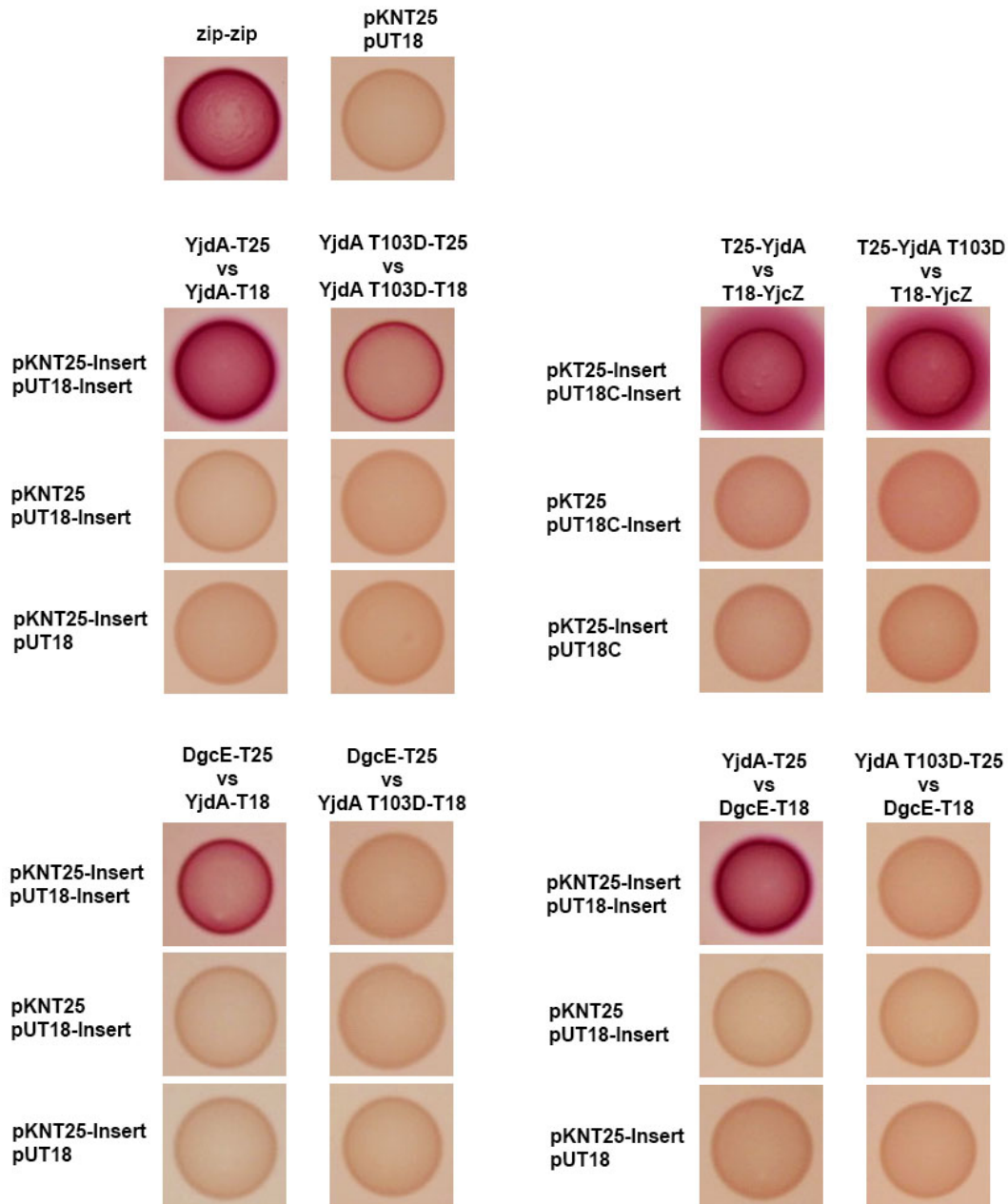


Abb. 24: GTPase-defizientes YjdA^{T103D} bewirkt eine gestörte Komplexbildung mit DgcE. *In vivo* Protein-Protein-Interaktionsstudien nach Karimova *et al.* (1998) wurden mit DgcE, YjdA, YjdA^{T103D} und YjcZ durchgeführt. Interaktionsstudien, die DgcE beinhalteten sowie die Dimerisierung von YjdA untersuchten, wurden mit Fusionsproteinen durchgeführt, die am C-Terminus die CyaA-Untereinheiten T25 bzw. T18 aufwiesen und von pKNT25 bzw. pUT18 exprimiert wurden. Die Interaktion zwischen YjdA und YjcZ wurde mit Fusionsproteinen durchgeführt, die am N-Terminus die CyaA-Untereinheiten T25 bzw. T18 aufwiesen und von pKT25 bzw. pUT18C exprimiert wurden. pKNT25- und pUT18-Derivate bzw. pKT25 und pUT18C-Derivate wurden in W3110 Δ cyaA co-exprimiert, resultierende Transformanten in H₂O resuspendiert und 5 μ l der Suspension auf MacConkey-Platten (+1 % Maltose, + Amp, + Kan) bei 28 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte nach 1 d. Bei einer Interaktion wird die CyaA-Aktivität wiederhergestellt, was die Verwertung von Maltose ermöglicht und aufgrund der Ansäuerung zu einer Rotfärbung führt. Die Interaktion des Leucin-Zippers des Hefeproteins GCN4 (zip-zip) diente als Positivkontrolle, Ansätze mit Leerplasmiden als Negativkontrollen.

Es kann festgehalten werden, dass eine fehlerhafte GTPase-Aktivität von YjdA zu einer stark reduzierten Biofilmbildung führt, die der von *dgcE*- bzw. *yjdA-yjcZ*-Deletionsmutanten gleicht. Dies geht mit einer gestörten Komplexbildung von DgcE und YjdA einher, die folglich notwendig für die DgcE-Aktivitätskontrolle seitens YjdA und YjcZ ist. Die GTPase-Aktivität von YjdA spielt demnach eine entscheidende Rolle für die Synthese extrazellulärer Matrixsubstanzen und ist somit notwendig für eine aktivierende Wirkung auf die DgcE-vermittelte *csgD*-Expression.

4.1.3.6 DgcE/YjdA/YjcZ regulieren das PdeR/DgcM/MlrA-Modul nicht ausschließlich über die DGC-Aktivität von DgcE

Um Näheres über den Wirkmechanismus von DgcE/YjdA/YjcZ auf das PdeR/DgcM/MlrA-Modul in Erfahrung zu bringen, wurde untersucht, ob vorwiegend die c-di-GMP-Produktion von DgcE entscheidend ist, oder zusätzlich eine spezifische lokale Regulation besteht.

Dazu wurde die Matrixproduktion bei DgcE-Überexpression von dem Niedrigkopien-Vektor pCAB18 in verschiedenen Stämmen verfolgt. Hierbei ist zu beachten, dass pCAB18-kodiertes *dgcE* zum einen in multiplen Kopien in der Zelle vorliegt und zum anderen aufgrund des *tac*-Promotors von der Regulation durch σ^S entkoppelt ist. Dies resultiert in einer deutlichen Überexpression von DgcE in sämtlichen Wachstumsphasen.

Die Überexpression von DgcE in einem $\Delta dgcE$ -Stammhintergrund erzeugte eine sich vom Wildtyp unterscheidende Makrokolonie, die in der Mitte sehr flach mit hohen radial verlaufenden Stegen war und einen kleinteilig strukturierten Rand aufwies (Abb. 25A).

Dieser Phänotyp ähnelte einer Makrokolonie wie sie auch durch die Überexpression der DGC DgcC entsteht (Abb. 25B). Bereits in der Dissertation von Dr. Anja Richter (2016) wurde solch ein DgcC-überexprimierender Phänotyp beschrieben, der auf erhöhte pEtN-Cellulosesynthese zurückzuführen war. Die Cellulosesynthase-Untereinheit BcsA weist eine sehr niedrige Bindeaffinität für c-di-GMP auf (Pultz et al., 2012), sodass die Produktion von pEtN-Cellulose unter physiologischen Bedingungen auf lokaler Signaltransduktion beruht, wobei ausreichende c-di-GMP-Konzentrationen von DgcC in unmittelbarer Nähe von BcsA generiert werden müssen (Richter, 2016). Bei genügend hohen c-di-GMP-Konzentrationen in der Zelle kann die Cellulosesynthese jedoch artifiziell unspezifisch erhöht werden.

Die gemessenen zellulären c-di-GMP-Konzentrationen waren bei DgcE-Überexpression sogar noch stärker erhöht als bei DgcC-Überexpression (Abb. 25C), was auf DgcE-generiertes c-di-GMP zurückzuführen war und erhöhte pEtN-Cellulosesynthese hervorrief.

Auf die Expression von Curli hingegen hatten die stark erhöhten c-di-GMP-Mengen lediglich einen geringen Einfluss, was anhand einer nur leicht erhöhten *csgB::lacZ*-Reporterexpression deutlich wurde. Diese erreichte nicht einmal wildtypisches Niveau [vgl. ($\Delta dgcE$ + pCAB18-*dgcE*) mit (wt + pCAB18) in Abb. 26].

Die Überexpression von DgcE in einem $\Delta dgcE$ -Stamm resultierte also vornehmlich in erhöhter pEtN-Celluloseexpression aufgrund einer erhöhten zellulären c-di-GMP-Konzentration. Im Gegensatz dazu wurde die Curli-Synthese kaum erhöht, sodass dafür mehr als nur erhöhte zelluläre c-di-GMP-Konzentrationen notwendig sind.

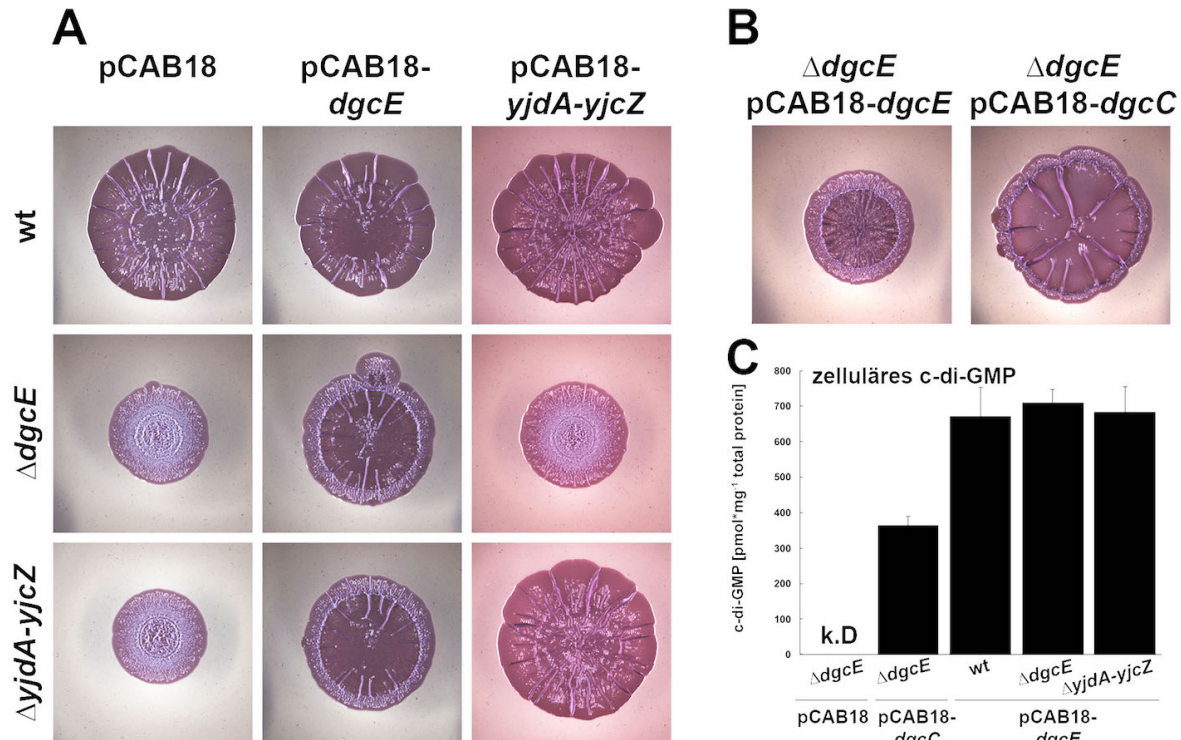


Abb. 25: Die Überexpression von DgcE erzeugt einen von YjdA-YjcZ unabhängigen Cellulose-überproduzierenden Phänotypen aufgrund stark erhöhter zellulärer c-di-GMP-Konzentrationen. (A & B) Nach der Transformation von AR3110 (wt), AR3110 $\Delta dgcE$ und AR3110 $\Delta yjdA-yjcZ$ mit pCAB18 und pCAB18-Derivaten wurden Makrokolonien durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten (+ Amp) und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. **(C)** Zelluläre c-di-GMP-Konzentrationen wurden ermittelt aus W3110 (wt) und Derivaten ($\Delta dgcE$, $\Delta yjdA-yjcZ$), die zuvor mit pCAB18-Derivaten transformiert wurden und in LB/Amp bei 28 °C bis zu einer OD₅₇₈ = 3 herangezogen wurden. Die Daten resultieren aus Triplikaten. Für Proben, die mit k.D. (keine Detektion) gekennzeichnet sind, konnten keine c-di-GMP-Konzentrationen ermittelt werden, da diese so gering waren, dass sie unterhalb der Detektionsgrenze lagen.

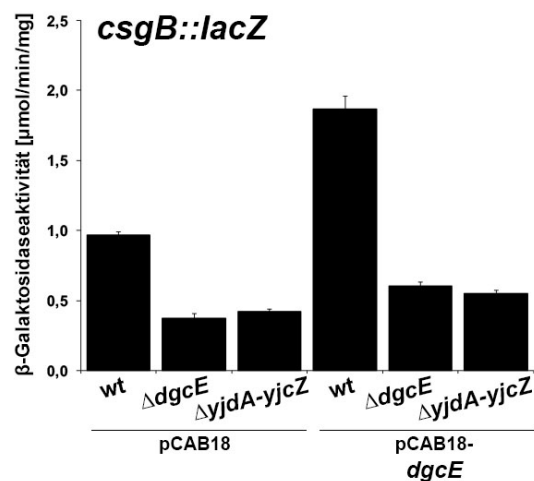


Abb. 26: Die Überexpression von DgcE wirkt sich in *dgcE*- und *yjdA-yjcZ*-Deletionsmutanten kaum auf die Curli-Expression aus. Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterergenfusion in W3110 $\Delta lac(I-A)$ (wt) und Derivaten, die mit pCAB18 bzw. pCAB18-*dgcE* transformiert wurden, erfolgte nach 24 h Wachstum in LB (+ Amp) bei 28°C. Die Daten resultieren aus Triplikaten.

Die erhöhte Expression von pEtN-Cellulose und geringe Expression von *csgB::lacZ* bei stark erhöhter c-di-GMP-Produktion war unabhängig von YjdA und YjcZ, da eine DgcE-Überexpression in einer $\Delta yjdA$ -*yjcZ*-Mutante die gleichen Auswirkungen auf die Matrixsynthese hatte wie in einer $\Delta dgcE$ -Mutante (Abb. 25 & 26).

Interessanterweise bewirkte die Überexpression von DgcE im AR3110-Stamm (wt) einen anderen Makrokoloniephänotypen als in den $\Delta dgcE$ - und $\Delta yjdA$ -*yjcZ*-Stämmen. Die Makrokolonie wies einen Phänotypen auf, der auf eine erhöhte Synthese von sowohl Curli-Fimbrien als auch pEtN-Cellulose hindeutete (Abb. 25A). Dieser Befund wurde zum einen untermauert durch eine hohe zelluläre c-di-GMP-Konzentration (Abb. 25C), die wie oben beschrieben vermutlich durch unspezifische Aktivierung von BcsA die pEtN-Cellulosesynthese erhöht. Zum anderen zeigte eine 2-fach erhöhte *csgB::lacZ*-Expression auch vermehrte Curli-Expression an (Abb. 26).

Eine Überexpression von YjdA-YjcZ (pCAB18-*yjdA-yjcZ*) machte im AR3110-Stamm hingegen keinen Unterschied und konnte auch den stark reduzierten Makrokolonie-Phänotypen einer $\Delta dgcE$ -Mutante nicht komplementieren (Abb. 25A). Bei der Abwesenheit von DgcE hatte demnach auch eine erhöhte Expression von YjdA-YjcZ keinen Einfluss auf die Matrixproduktion, was weiterhin zeigte, dass YjdA und YjcZ einen spezifischen aktivierenden Einfluss auf DgcE haben.

Die Daten bezüglich der DgcE-Überexpression in $\Delta dgcE$ und $\Delta yjdA$ -*yjcZ*-Mutanten zeigen, dass eine erhöhte c-di-GMP-Produktion durch DgcE zwar in vermehrter pEtN-Cellulosesynthese resultiert, nicht aber für die Aktivierung der *csgB*- und folglich Curli-Expression ausreichend ist. Demnach muss die Regulation des PdeR/DgcM/MlrA-Moduls durch DgcE/YjdA/YjcZ auch auf einem weiteren, vermutlich lokalen, Regulationsprozess beruhen, wodurch letztlich die *csgD*- und *csgB*-Expression begünstigt werden kann (vgl. Diskussion 5.4). Lediglich im Wildtypstamm konnte die Curli-Expression bei DgcE-Überexpression erhöht werden. Dies legt eine spezifische Bedeutung der chromosomalen *dgcE*-Kopie nahe, die im Wildtypstamm zusätzlich zu plasmidkodiertem *dgcE* exprimiert wird.

4.1.3.7 Ist PdeR durch Proteininteraktionen mit DgcE und YjdA assoziiert ?

Um CsgD-vermittelte Matrixsynthese zu gewährleisten, muss das Trigger-Enzym PdeR von seiner inhibitorischen Wirkung auf DgcM/MlrA abgehalten werden, indem es seine sekundäre PDE-Aktivität aufnimmt. Aufgrund der Tatsache, dass selbst überproduziertes c-di-GMP allein nicht ausreicht, um die Expression von *csgB::lacZ* anzukurbeln (vgl. 4.1.3.6), muss ein zusätzlicher regulatorischer Mechanismus für die Aktivierung bestehen. Dieser könnte lokal durch direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen DgcE und PdeR erfolgen und wurde unter der Zuhilfenahme des Bacterial-Two-Hybrid-Assays nach Karimova *et al.* (Karimova *et al.*, 1998) untersucht.

Zu diesem Zweck sollten die Gensequenzen der zu testenden Proteine auf die vier Plasmide pKNT25, pUT18, pKT25 und pUT18C kloniert werden, sodass Fusionsproteine mit den CyaA-Untereinheiten T25 und T18 am C-terminus (pKNT25, pUT18) bzw. N-Terminus (pKT25, pUT18C) exprimiert werden. Dies sollte Interaktionsanalysen anhand sämtlicher Plasmidkombinationen ermöglichen (pKNT25/pUT18, pKNT25/pUT18C, pKT25/pUT18, pKT25/pUT18C). Die Klonierung von *pdeR* auf pKT25 gelang jedoch nicht und konnte in die Studie nicht mit einbezogen werden. Ein generelles Problem bestand in der Toxizität für Zellen während der Überexpression von PdeR-Fusionsproteinen. Nach der Co-Transformation mit Plasmiden, die *pdeR* kodierten, konnten oftmals gar keine oder lediglich wenige Transformanten generiert werden. Dennoch konnten letztlich einige Transformanten erzeugt und analysiert werden.

Eine eindeutige direkte Interaktion zwischen DgcE und PdeR konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Lediglich für die Kombination aus PdeR-T25 und DgcE-T18 (von pKNT25 bzw. pUT18) war nach 2 d Inkubation eine leichte Rotfärbung der entsprechenden Kolonie zu beobachten (Abb. 27A).

Da PdeR ein lösliches Protein ist und über DgcM/MlrA vermutlich an der *csgD*-Promotorregion assoziiert ist, DgcE hingegen membrangebunden ist, ist davon auszugehen, dass PdeR an die Membran gelangen muss, um mit DgcE interagieren zu können. Läge DgcE von vornherein löslich vor, könnte es folglich zu einer verstärkten Interaktion mit PdeR im Interaktionsexperiment kommen. Die Interaktion zwischen PdeR und löslichem DgcE (DgcE^{ΔTM}) sollte daraufhin analysiert werden. Dies gelang jedoch nicht, da keine Transformanten erzeugt werden konnten.

Da DgcE nachweislich mit YjdA interagiert (4.1.3.3, 4.1.3.4), bestand die Möglichkeit, dass PdeR durch eine direkte Interaktion mit YjdA in unmittelbare Nähe von DgcE gelangen könnte. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine mögliche Interaktion zwischen PdeR und YjdA untersucht. Nach 1 d Inkubation konnte für keine der getesteten Kombinationen Rotfärbung und somit Interaktion beobachtet werden. Nach 2 d zeigten jedoch Kombinationen mit C-terminal fusionierten T-Fragmenten eine Rotfärbung (Abb. 27B).

Auch wenn die hier durchgeführte Interaktionsstudie aufgrund der PdeR-vermittelten Zelltoxizität keine optimalen und eindeutigen Ergebnisse lieferte, weisen diese Daten darauf hin, dass PdeR direkt oder indirekt über YjdA mit DgcE in Kontakt tritt, wodurch lokale Signaltransduktion ermöglicht werden könnte (vgl. Diskussion 5.4).

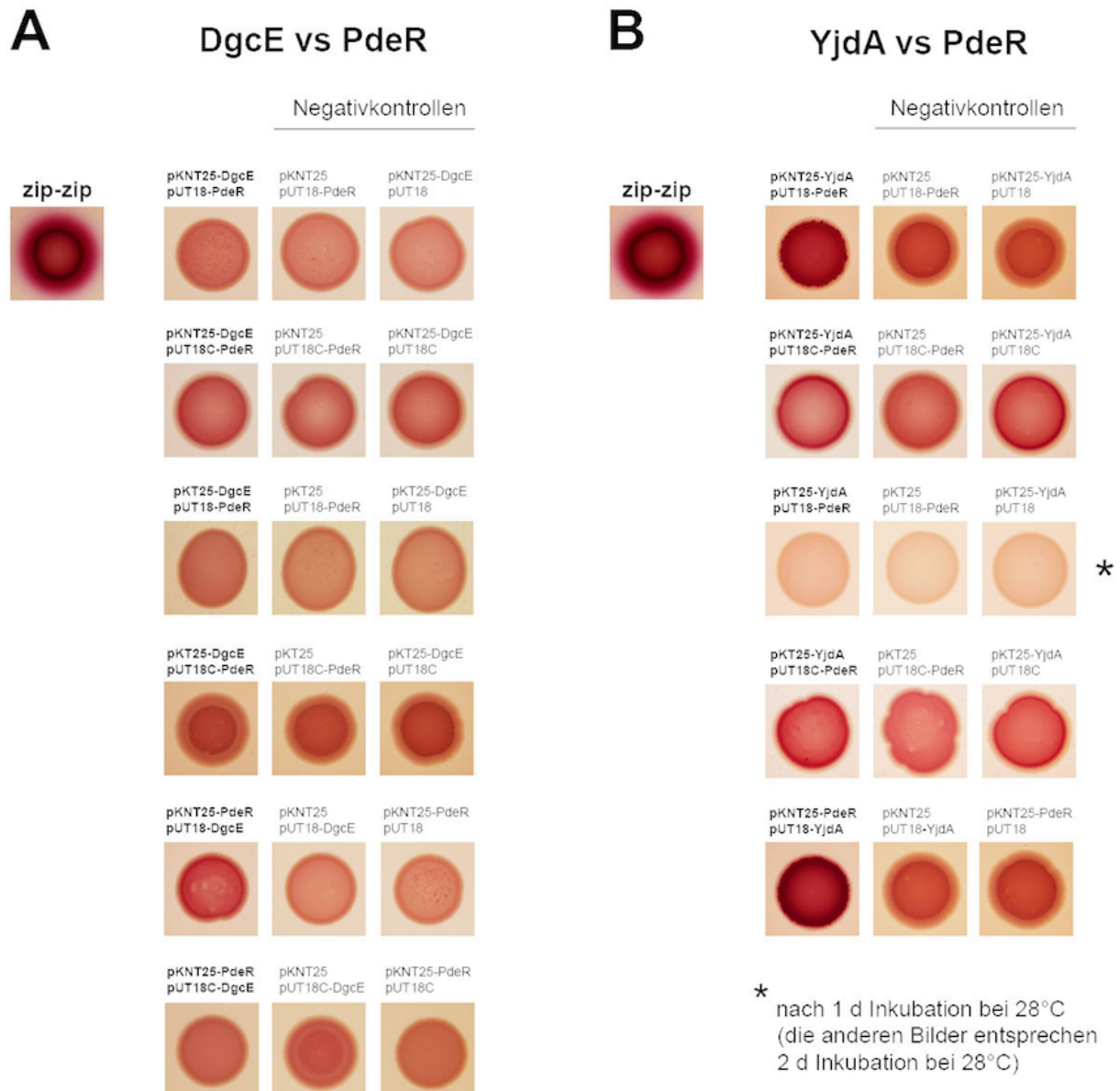


Abb. 27: PdeR interagiert nicht direkt mit DgcE, könnte aber über eine Interaktion mit YjdA mit DgcE assoziiert sein. Mithilfe von *in vivo* Protein-Protein-Interaktionsstudien nach Karimova *et al.* (1998) wurde PdeR auf Interaktionen mit (A) DgcE und (B) YjdA getestet. Interaktionsstudien wurden mit Fusionsproteinen durchgeführt, die die CyaA-Untereinheiten T25 bzw. T18 am C-Terminus (von pKNT25 bzw. pUT18 exprimiert) bzw. am N-Terminus (von pKT25 bzw. pUT18C exprimiert) aufwiesen. Interaktionen mit von pKT25 exprimiertem *pdeR* konnte nicht getestet werden, da die Klonierung dieses Konstruktes nicht gelang. Die bezeichneten Plasmide wurden in W3110 Δ *cyaA* co-exprimiert, resultierende Transformanten in H₂O resuspendiert und 5 μ l der Suspension auf MacConkey-Platten (+1 % Maltose, + Amp, + Kan) bei 28 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte nach 1 d (*) oder 2 d. Bei einer Interaktion wird die CyaA-Aktivität wiederhergestellt, was die Verwertung von Maltose ermöglicht und aufgrund der Ansäuerung zu einer Rotfärbung führt. Die Interaktion des Leucin-Zippers des Hefeproteins GCN4 (zip-zip) diente als Positivkontrolle, Ansätze mit Leerplasmiden als Negativkontrollen.

4.1.4 Analyse der TM-Domäne von DgcE

Für die Gesamtheit der zehn Transmembrandomänen (TM) von DgcE wurde in den vorangegangenen Kapiteln ein aktivierender Einfluss auf die Matrixsynthese festgestellt, wobei ein direkter Kontakt mit dem Aktivatorprotein YjdA beobachtet wurde. Die offensichtlich bedeutende Rolle dieser TM-Domänen sollte im Folgenden differenzierter untersucht werden. Die zu Beginn dieser Arbeit als MASE1 annotierte Domäne (TM 1-8) sowie die zwei weiteren Transmembrandomänen (TM 9+10) wurden daher getrennt voneinander analysiert.

4.1.4.1 Eine chromosomale *dgcE*^{ΔMASE1}-Mutante zeigt eine reduzierte Matrixsynthese

Es wurde eine chromosomal kodierte *dgcE*-Mutante erzeugt, der die Sequenz für die ersten 8 Transmembrandomänen, also die MASE1-Domäne, fehlt (*dgcE*^{ΔMASE1}). Dabei wurde der originale N-Terminus von *dgcE* (kodiert für MSK) beibehalten und an die TMs 9 und 10 fusioniert, die somit erhalten blieben.

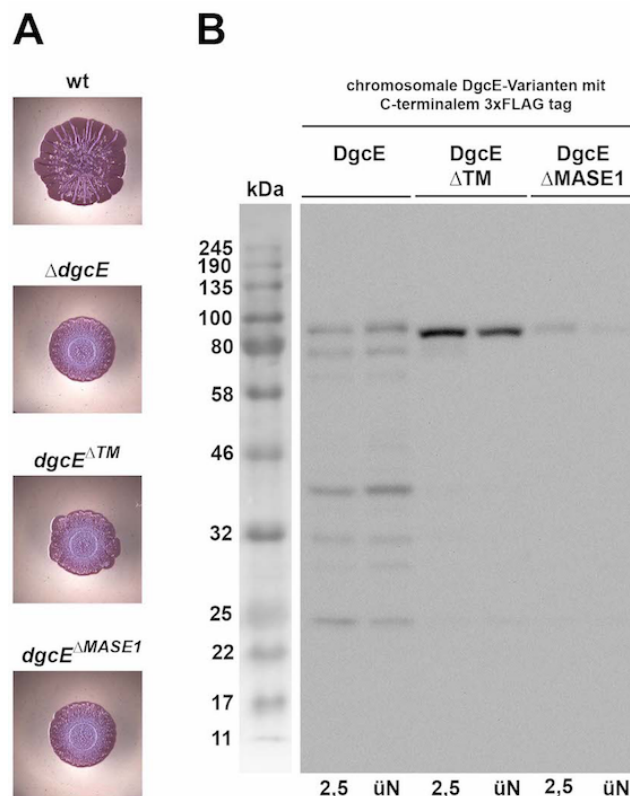


Abb. 28: Eine chromosomale *dgcE*^{ΔMASE1}-Mutante ist in seiner Biofilmmatrixsynthese reduziert und weist vergleichsweise geringe zelluläre Proteinmengen auf. (A) Makrokolonien von AR3110 (wt) sowie Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 µl Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. **(B)** Immunoblotdetektion unterschiedlicher chromosomal kodierter 3x-FLAG-markierter DgcE-Varianten nach Wachstum entsprechender W3110-Derivate in Flüssigmedium (LB) bei 28 °C erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers. Probennahmen erfolgten bei einer OD₅₇₈ = 2,5 und nach 24 h (üN). Die Proben samt Marker wurden auf dasselbe Gel geladen. Aufgrund unterschiedlich starker Signalintensitäten während der Detektion wurde der Markerbereich weniger stark kontrastiert. Ein Bereich zwischen Marker und den Proben wurde entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden.

Die Analyse von Makrokolonien ergab, dass die *dgcE*^{ΔMASE1}-Mutante in ihrer Fähigkeit zur Biofilmmatrixsynthese in gleichem Maße reduziert war wie die Δ*dgcE*- und *dgcE*^{ΔTM}-Mutanten (Abb. 28A). Die Analyse der zellulären Proteinmengen mittels Immunoblotdetektion zeigte jedoch, dass DgcE^{ΔMASE1}::3xFLAG im Gegensatz zu DgcE::3xFLAG und DgcE^{ΔTM}::3xFLAG kaum in der Zelle vorlag (Abb. 28B). Da die *dgcE*^{ΔMASE1}-Mutante die gleichen chromosomalen Expressionssignale aufweist wie wildtypisches *dgcE*, gehen die geringen DgcE^{ΔMASE1}::3xFLAG-Proteinmengen wahrscheinlich eher auf einen verstärkten Abbau als auf eine verminderte Expression zurück.

Der reduzierte Makrokolonie-Phänotyp ist folglich auf verringerte DgcE^{ΔMASE1}-Proteinmengen zurückzuführen, sodass anhand der chromosomalen Mutante keine Schlussfolgerungen bezüglich der MASE1-Domäne gezogen werden konnten.

4.1.4.2 Überexprimiertes DgcE^{ΔMASE1} erzeugt einen von c-di-GMP und YjdA-YjcZ unabhängigen Δ*pdeR*-ähnlichen Phänotypen

Da sich herausstellte, dass eine chromosomale *dgcE*^{ΔMASE1}-Mutante ungeeignet ist, um potentiell unterschiedliche Funktionen für die MASE1-Domäne (TM 1-8) und die TM 9+10 ausmachen zu können (vgl. 4.1.4.1), wurde *dgcE*^{ΔMASE1} auf pCAB18 kloniert und in Komplementationsexperimente eingeschlossen. Hierfür wurde eine chromosomale *dgcE*-Deletionsmutante mit sämtlichen pCAB18-Derivaten (C-terminal 6His-markierte *dgcE*-Varianten, die alle für den gleichen N-Terminus kodieren: MSK) transformiert und anschließend mittels Makrokolonie-Analysen auf ihre Fähigkeit zur Komplementation hin untersucht. Zusätzlich wurden die zellulären c-di-GMP-Konzentrationen aus Flüssigkulturen bestimmt (Abb. 29).

Während pCAB18-kodiertes DgcE^{GGAFF}::6His und DgcE^{ΔPAS3}::6His in einer *dgcE*-Deletionsmutante die Synthese von Biofilmmatrix nicht wiederherstellen konnten (Abb. 29A), diese Phänotypen somit die entsprechenden chromosomal generierten Mutationen widerspiegeln (vgl. Abb. 7A) und keine detektierbaren c-di-GMP-Mengen durch DgcE^{GGAFF}::6His und DgcE^{ΔPAS3}::6His produziert werden konnten (Abb. 29B), waren deutliche Unterschiede zwischen den Varianten mit veränderten TM-Regionen auszumachen:

Trotz gleicher Expressionssignale sämtlicher pCAB18-Derivate waren die zellulären Proteinmengen an DgcE^{ΔMASE1}::6His im Vergleich zu denen von DgcE^{ΔTM}::6His und TM1+2^{LacY}::DgcE^{ΔTM}::6His eher gering (Abb. 30), sodass auch ein verstärkter Abbau der plasmidkodierten DgcE^{ΔMASE1}::6His-Variante zu vermuten ist (vgl. mit chromosomal kodiertem DgcE^{ΔMASE1}::3xFLAG in Abb. 28B).

Dennoch wurde durch die Proteinexpression von DgcE^{ΔMASE1}::6His eine Makrokolonie generiert, die aufgrund ihrer flachen und größeren Erscheinung mit wenigen, aber sehr hohen radial verlaufenden Stegen auf stark erhöhte Produktion von Curli-Fimbrien und pEtN-

Cellulose schließen ließ und der einer *pdeR*-Deletionsmutante glich (Abb. 29A). Dieser Phänotyp ging nicht mit einer hohen zellulären c-di-GMP-Konzentration einher, da die c-di-GMP-Konzentration bei der Expression von pCAB18-*dgcE*^{ΔMASE1}::6His genau wie bei der Expression der Leervektorkontrolle (pCAB18-leer) bei der Messung unter der Detektionsgrenze lag und somit keinen Wert lieferte. DgcE^{ΔMASE1}::6His weist folglich keine erhöhte DGC-Aktivität auf wie DgcE::6His (Abb. 29B). Zudem wurde der Makrokoloniephänotyp (*dgcE*^{ΔMASE1}::6His) unabhängig vom Vorhandensein von YjdA und YjcZ generiert (Abb. 31).

Lösliches DgcE^{ΔTM}::6His war hingegen kaum dazu in der Lage, Biofilmmatrix wiederherzustellen und auch die c-di-GMP-Synthese war so gering, dass keine Detektion stattfinden konnte. Dies ließ vermuten, dass die TMs 9+10, die bei DgcE^{ΔMASE1}::6His noch vorhanden sind, für den beobachteten Matrix-überproduzierenden Phänotypen verantwortlich waren. Dabei spielte die Anwesenheit der DgcE-eigenen TMs 9+10 eine spezifische Rolle, die nicht durch die ersten beiden TMs von LacY übernommen werden konnten. TM1+2^{LacY}::DgcE^{ΔTM}::6His hatte zwar eine gewisse komplementierende Wirkung, resultierte jedoch in einem deutlich reduzierteren Phänotypen als DgcE^{ΔMASE1}::6His (Abb. 29).

Plasmidkodiertes DgcE^{ΔEAL}::6His wies eine hohe DGC-Aktivität auf, was in einer stark erhöhten zellulären c-di-GMP-Konzentration erkennbar wurde (Abb. 29B). Dabei wurde nicht der Makrokolonie-Phänotypen einer chromosomalen *dgcE*^{ΔEAL}-Mutante erzeugt, sondern ein Phänotyp, der bei der Überexpression von DgcE::6His beobachtet wurde (vgl. Abb. 29A & 7A) und auf die unspezifische Aktivierung der Cellulosesynthase BcsA hindeutete. Dadurch erfolgt v. a. eine vermehrte Expression von pEtN-Cellulose, sodass sich das Verhältnis der Matrixbestandteile verändert (vgl. 4.1.3.6).

Die Daten zeigen, dass plasmidkodiertes DgcE^{ΔMASE1}::6His trotz vergleichsweise geringen zellulären Proteinmengen (vermutlich wegen vermehrtem Abbau) stark aktivierend auf die Matrixsynthese wirkt, woraus sich eine inhibitorische Rolle der MASE1-Domäne (TM 1-8) ableiten lässt. Dieser Effekt ist unabhängig von YjdA und YjcZ, was darauf hinweist, dass diese Proteine dem inhibitorischen Effekt der MASE1-Domäne entgegenwirken und so DgcE zur Aktivierung der DgcM/MlrA-vermittelten *csgD*-Expression befähigen könnten. Fehlt die MASE1-Domäne von vornherein, bedarf es dann keiner Aktivierung seitens YjdA und YjcZ mehr.

Die Tatsache, dass die Überexpression von DgcE^{ΔMASE1}::6His nicht mit erhöhter DGC-Aktivität korreliert, aber einen Δ*pdeR*-ähnlichen Phänotypen generiert, zeigt, dass hier wahrscheinlich lokale Signaltransduktion zustande kommt, wobei der inhibitorische Effekt von PdeR auf DgcM und MlrA ausgeschaltet wird. Da spezifisch die DgcE-eigenen TMs 9+10 für den Δ*pdeR*-ähnlichen Phänotypen vonnöten sind, scheinen diese an der aktiven Form von DgcE beteiligt zu sein (vgl. Diskussion 5.1.3).

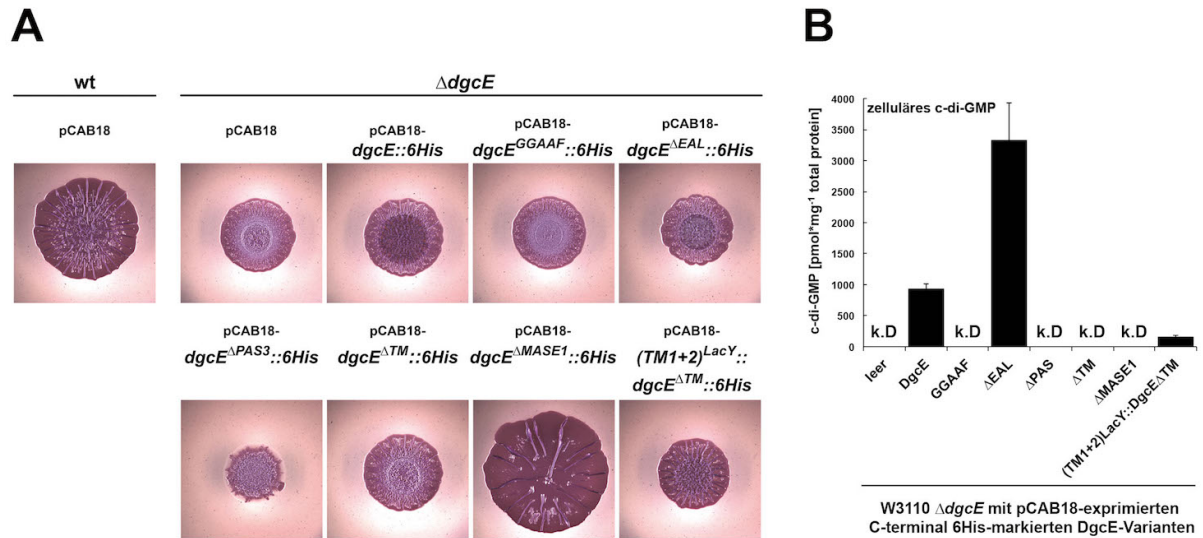


Abb. 29: Plasmidkodiertes DgcE^{MASE1}::6His erzeugt einen c-di-GMP-unabhängigen $\Delta pdeR$ -ähnlichen Phänotypen. (A) Nach der Transformation von AR3110 (wt) und seinem Derivat $\Delta dgcE$ mit pCAB18 und pCAB18-Derivaten wurden Makrokolonien durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten (+ Amp) und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. (B) Zelluläre c-di-GMP-Konzentrationen wurden aus W3110 $\Delta dgcE$ ermittelt, die zuvor mit pCAB18 (leer) und pCAB18-Derivaten aus (A) transformiert wurden und in LB/Amp bei 28 °C bis zu einer OD₅₇₈ = 3 herangezogen wurden. Die Daten resultieren aus Triplikaten. Für Proben, die mit k.D. (keine Detektion) gekennzeichnet sind, konnten keine c-di-GMP-Konzentrationen ermittelt werden, da diese so gering waren, dass sie unterhalb der Detektionsgrenze lagen.

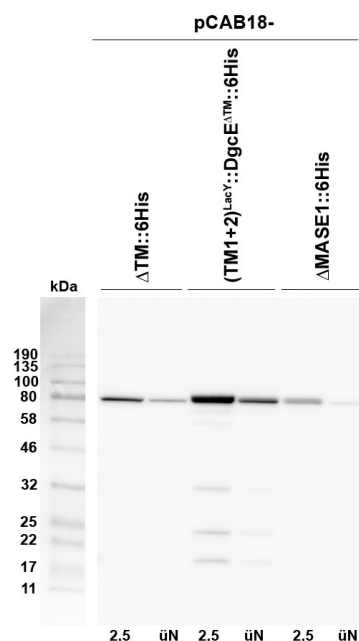


Abb. 30: Plasmidkodiertes DgcE^{MASE1}::6His weist vergleichsweise geringe zelluläre Proteinmengen auf. Die Immunoblotdetektion unterschiedlicher pCAB18-kodierter 6His-markierter DgcE-Varianten im W3110-Stammhintergrund erfolgte nach Wachstum in Flüssigmedium (LB/Amp) bei 28 °C. Probennahmen erfolgten bei einer OD₅₇₈ = 2,5 und nach 24 h (üN). Die Detektion erfolgte mithilfe eines spezifischen anti-6His-Antikörpers. Sichtbar sind lediglich solche Fragmente, die den C-terminalen 6His-tag beinhalten. Die Proben samt Marker wurden auf dasselbe Gel geladen. Ein Bereich zwischen Marker und den Proben wurde entfernt, wobei die originalen Größenverhältnisse beibehalten wurden.



Abb. 31: Der durch plasmidexprimiertes $DgcE^{\Delta MASE1::6His}$ erzeugte $\Delta pdeR$ -ähnliche Phänotyp ist unabhängig von YjdA-YjcZ. Nach der Transformation von AR3110 (wt) und den Derivaten $\Delta dgcE$ und $\Delta yjdA-yjcZ$ mit pCAB18 bzw. pCAB18- $dgcE^{\Delta MASE1::6His}$ wurden Makrokolonien durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten (+ Amp) und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt

4.2 Analyse von neu identifizierten Curli-Kontrollgenen

In der Arbeitsgruppe um Dr. A. Typas am EMBL in Heidelberg wurde eine Reihe von Deletionsmutanten identifiziert, die in ihrer Expression an extrazellulären Matrixkomponenten gestört waren. Das entsprechende Mutanten-Screening wurde auf Kongorot-haltigem Medium durchgeführt, wobei einerseits die *Keio Knockout Collection* - eine Sammlung des *E. coli* Stammes BW25113, die Gendeletionsmutanten sämtlicher nicht-essentieller Gene aus *E. coli* K 12 beinhaltet (Baba et al., 2006) - verwendet wurde und andererseits Derivate des Curli- und pEtN-Cellulose-produzierenden AR3110-Stammes analysiert wurden. Unter den selektierten Genen, deren Deletion im AR3110-Hintergrund eine verminderte Kongorot-Bindung sowie Koloniestrukturierung hervorriefen, fanden sich neben *dgcE*, *yjdA* und *yjcZ* auch solche, die bisher mit keinen biofilmrelevanten Funktionen in *E. coli* assoziiert worden sind (A. Typas, unveröffentlicht). Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe um Prof. R. Hengge von der Humboldt-Universität zu Berlin sollte die Rolle dieser Gene während der Matrixproduktion näher untersucht werden, was einen Teil dieser Dissertation darstellt.

Die von Dr. Typas selektierten Mutanten wiesen Deletionen von kompletten Gensequenzen auf. Da einige der selektierten Gene jedoch in Operonen organisiert sind und es somit zu Überlappungen von Gensequenzen kommt, wurden die Deletionen der identifizierten potentiell biofilmrelevanten Gene im AR3110-Stammhintergrund mittels Ein-Schritt-Inaktivierung (vgl. 3.6.14) im Rahmen dieser Arbeit erneut erzeugt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Expression von stromabwärts und stromaufwärts gelegenen Gene bzw. Operonen nicht beeinträchtigt wurde.

Anhand von Makrokolonien wurden die Mutanten daraufhin auf ihre biofilmbildenden Eigenschaften untersucht. Zu den Genen, deren Deletion auch hier einen reduzierten Phänotypen zeigten und daraufhin in weitere Analysen einbezogen wurden, gehörten *dgcE*, *yjdA*, *yjcZ*, *rbsK*, *rbsR*, *ydcl*, *yieP* und *puuR*.

Von diesen Genen wurde neben *dgcE*, *yjdA* und *yjcZ*, deren Genprodukte bereits als Regulatoren der Biofilmbildung in *E. coli* beschrieben wurden (vgl. 4.1 und Suchanek, 2016), lediglich *ydcl*, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, mit biofilmbildenden Eigenschaften in *S. Typhimurium* assoziiert (Jennings et al., 2011).

Nicht nur *yjdA* und *yjcZ* bilden eine Transkriptionseinheit, sondern auch *rbsK* und *rbsR* sind im gleichen Operon organisiert (*rbsDACBKR*), wobei RbsK und RbsR am Ribose-Metabolismus beteiligt sind (Hope et al., 1986; Mauzy and Hermodson, 1992).

Das Gen *yieP* liegt in einem Operon (*yieP-hsrA*), welches divergent zum *rbs*-Operon verläuft und mit diesem überlappt. YieP ist vermutlich ein Transkriptionsregulator, über dessen Funktion bislang nichts bekannt ist.

Das Gen *puuR* ist Teil des *puuDRCBE*-Operons. Als Transkriptionsrepressor der *puu*-Gene ist PuuR an der Regulation der Verwertung des Polyamins Putrescin beteiligt, welches als Kohlen- und Stickstoffquelle dient (Nemoto et al., 2012).

4.2.1 RbsK, RbsR, YdcI, YieP und PuuR greifen nicht in die PdeR/DgcM/MlrA-vermittelte *csgD*-Expression ein

Sämtliche Deletionsmutanten wurden auf ihre Fähigkeit zur Matrixexpression hin untersucht, wodurch die Wirkungsposition der Genprodukte innerhalb des Matrix-Kontrollnetzwerkes (vgl. Abb. 2) bestimmt werden sollte.

Hierzu wurden entsprechende Makrokolonien analysiert (Abb. 32A oben) und die Auswirkungen aller Deletionen auf die zellulären RpoS-, MlrA- und CsgD-Proteinmengen (Abb. 32B) sowie auf die Curli-Expression anhand einer *csgB::lacZ*-Reporter-genfusion (Abb. 32C) untersucht.

Außerdem wurden sämtliche Mutationen in dem Stammhintergrund von AR3110 $\Delta dgcM\Delta pdeR$ erzeugt, um zu testen, ob die neu identifizierten Genprodukte in die c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion auf Ebene des PdeR/DgcM/MlrA-Moduls eingreifen (Abb. 32A unten). In solch einem Stamm ($\Delta dgcM\Delta pdeR$) erfolgen die *csgD*- und Curli-Expression unabhängig von c-di-GMP, da MlrA aufgrund fehlender Kontrolle der c-di-GMP-kontrollierten Komponenten PdeR und DgcM die *csgD*-Expression ständig aktiviert, wodurch ein Matrix-überproduzierender Phänotyp zustande kommt (größer und flacher mit weniger aber höheren Stegen).

Die *rbsK*- und *rbsR*-Deletionsmutanten waren sowohl in ihrem Wachstum als auch ihrer Matrixexpression am stärksten beeinträchtigt. Die glatten und weißlichen Kolonien ließen sowohl auf reduzierte Curli- als auch pEtN-Celluloseexpression schließen (Abb. 32A oben). Deletionen von *dgcE*, *yjdA* und *yjcZ* resultierten in den gleichen reduzierten Makrokolonien und wurden in Kapitel 4.1 ausführlich beschrieben. Makrokolonien der $\Delta ydcI$ -, $\Delta yieP$ - und $\Delta puuR$ -Mutanten bildeten noch am meisten Fältchen aus, waren jedoch im Vergleich zum AR3110-Wildtyp kleiner und unstrukturierter. Die zahlreichen kleinen Aufwölbungen ohne die Bildung hoch aufragender Stege lässt dabei v. a. auf verminderte Curli-Expression schließen (Abb. 32A oben, vgl. Abb. 4).

Immunoblotexperimente zeigten, dass RpoS- und MlrA-Proteinmengen in keiner der Mutanten signifikant beeinträchtigt waren. Die zellulären CsgD-Mengen offenbarten hingegen deutliche Unterschiede und korrelierten mit der entsprechenden *csgB::lacZ*-Expression, die als Indikator der Curli-Expression diente (Abb. 32B & C).

Für $\Delta dgcE$ -, $\Delta yjdA$ - und $\Delta yjcZ$ -Mutanten wurden sehr stark reduzierte Werte gemessen, die den reduzierten Makrokolonie-Phänotypen entsprachen. Auch die $\Delta yieP$ -Mutante zeigte in

gleichem Maße reduzierte CsgD-Proteinmengen und *csgB::lacZ*-Expressionen, obwohl die entsprechende Makrokolonie noch mehr Matrixsynthese zeigte als die der $\Delta dgcE$ -, $\Delta yjdA$ - und $\Delta yjcZ$ -Mutanten. Die Mutanten $\Delta rbsK$ und $\Delta rbsR$ waren ebenfalls deutlich in ihrer CsgD- und Curli-Expression beeinträchtigt, jedoch nicht so stark wie die zuvor beschriebenen Deletionsmutanten, was in Kontrast zu der äußerst starken Reduktion der $\Delta rbsK$ - und $\Delta rbsR$ -Makrokolonien stand. Während die $\Delta puuR$ -Mutante etwa um die Hälfte reduzierte Expressionen zeigte, resultierte die Deletion von *ydcl* nicht in verminderten CsgD-Mengen und *csgB::lacZ*-Expressionen (Abb. 32B & C).

In einer $\Delta dgcM\Delta pdeR$ -Mutante machten lediglich zusätzliche Deletionen von *dgcE*, *yjdA* und *yjcZ* keinen Unterschied mehr. Zusätzliche Deletionen von *rbsK*, *rbsR*, *ydcl*, *yieP* und *puuR* wirkten sich hingegen nach wie vor reduzierend auf die Biofilmbildung aus, sodass diese Genprodukte unabhängig des PdeR/DgcM/MlrA-Moduls wirken müssen (Abb. 32A unten).

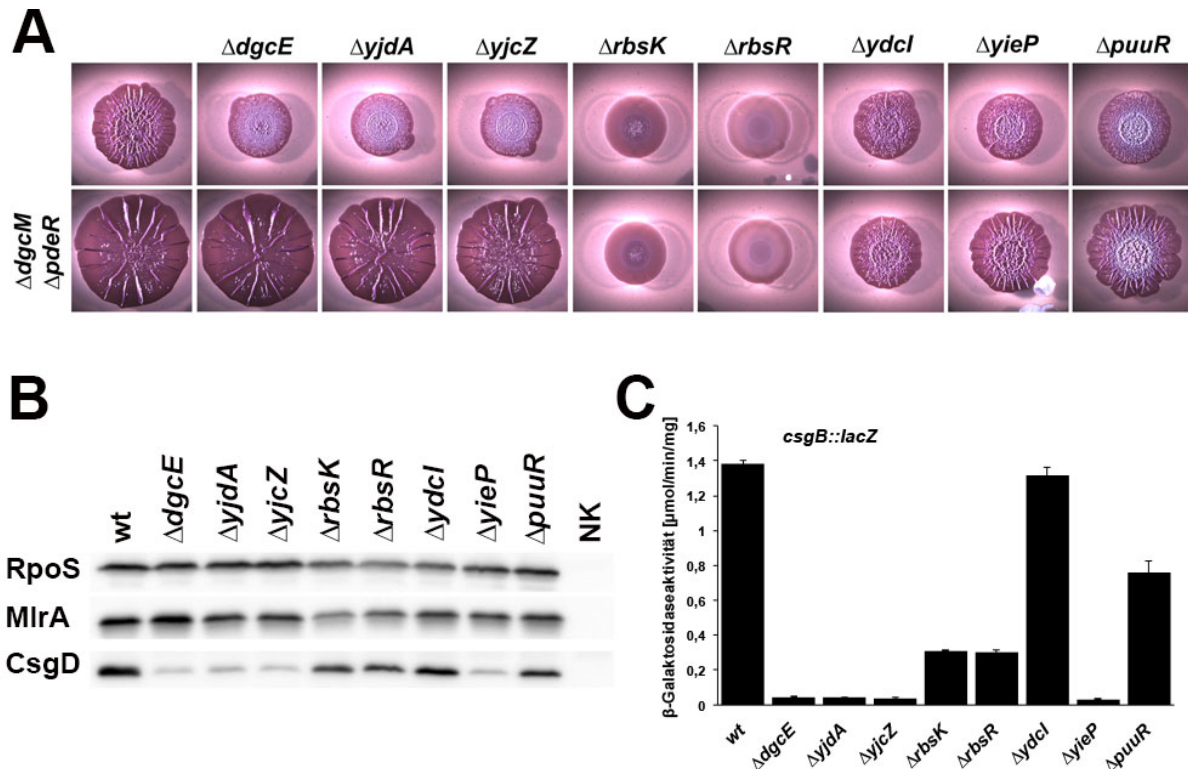


Abb. 32: Analyse von z. T. neu identifizierten biofilmrelevanten Genen. (A) Makrokolonien von AR3110 (oben links) sowie Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. **(B)** Die Immunoblotdetektion von RpoS und CsgD erfolgte aus in (A) verwendeten Mutanten. Für die Detektion von MlrA wurde ein Stamm verwendet, der für chromosomales *mlrA::3xFLAG* kodiert und in dem die entsprechenden Gendeletionen erzeugt wurden. Nach Wachstum in LB bei 28 °C bis zu einer $OD_{578} = 4$ wurden 6 μ g Gesamtprotein in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mithilfe von RpoS-, CsgD- und 3xFLAG-spezifischen Antikörpern. Als Wildtyp (wt) dienen AR3110 bzw. AR3110 *mlrA::3xFLAG*. Als Negativkontrollen (NK) dienten AR3110 (ohne 3xFLAG-markiertes Gen) sowie die Derivate $\Delta rpoS$ und $\Delta csgD$. **(C)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterergenfusion in W3110 $\Delta lac(I-A)$ (wt) sowie Derivaten nach 24 h Wachstum in LB bei 28 °C. Die Daten resultieren aus Triplikaten.

Diese Befunde bestätigen, dass YjdA und YjcZ auf Ebene von DgcE wirken und diese Proteine gemeinsam über das PdeR/DgcM/MlrA-Modul in die c-di-GMP-vermittelte *csgD*-Expression eingreifen (vgl. 4.1.3). Da die $\Delta ydcI$ -Mutante trotz reduzierter Biofilmbildung keine signifikant verringerte Expression an CsgD und Curli zeigte, muss die biofilmbildende Wirkung von YdcI der *csgB*-Expression nachgeschaltet sein. RbsK, RbsR, YieP und PuuR wirken unabhängig des PdeR/DgcM/MlrA-Moduls und in unterschiedlichem Maße auf die CsgD- und Curli-Expression ein. Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Proteine auf transkriptionaler oder translationaler Ebene von *csgD* einwirken, wodurch sowohl CsgD-Proteinmengen als auch die *csgB::lacZ*-Expression beeinflusst werden.

4.2.2 RbsK, RbsR, YdcI, YieP und PuuR wirken nicht auf Zellhüllstress-vermittelte *csgD*-Inhibition ein

Ausgehend von den Befunden aus Kapitel 4.2.1 wurde untersucht, ob die neu identifizierten biofilmrelevanten Proteine RbsK, RbsR, YdcI, YieP und PuuR auf die transkriptionale oder translationale Regulation von *csgD* einwirken und so zu erhöhter Proteinexpression des Biofilmmasterregulators CsgD beitragen könnten. Die *csgD*-Expression unterliegt sowohl positiver als auch negativer Kontrolle durch verschiedene Transkriptionsfaktoren und sRNAs. Zu den negativen Regulatoren gehören der Transkriptionsregulator CpxR sowie die sRNAs RprA und RybB, welche die *csgD*-Translation inhibieren. Diese Faktoren werden bei Zellhüllstress exprimiert und wirken der *csgD*-Expression entgegen (Mika and Hengge, 2014; Prigent-Combaret et al., 2001; Serra et al., 2016).

Durch den fehlenden negativen Einfluss von CpxR auf die *csgD*-Expression wies eine *cpxR*-Deletionsmutante erwartungsgemäß verstärkte Biofilmbildung auf (Abb. 33A). Wären die untersuchten Genprodukte an der Inhibition von CpxR beteiligt, dürften deren Deletionen in einem $\Delta cpxR$ -Stammb Hintergrund keine Auswirkungen mehr zeigen. Deletionen von *dgcE*, *yjdA*, *yjcZ*, *rbsK*, *rbsR*, *ydcI*, *yieP* und *puuR* resultierten in einem $\Delta cpxR$ -Stammb Hintergrund jedoch nicht in $\Delta cpxR$ -ähnlichen Makrokolonien, sondern wirkten sich nach wie vor reduzierend auf den Makrokoloniephänotypen aus (Abb. 33A). Sie haben folglich biofilmbildende Eigenschaften, die nicht auf der Inhibition von CpxR-vermittelter negativer *csgD*-Expressionskontrolle beruhen.

Anhand von Northernblotanalysen wurde zudem deutlich, dass Deletionen von *rbsK*, *rbsR*, *ydcI*, *yieP* und *puuR* keine erhöhten zellulären Mengen an RprA und RybB bewirken. Eine $\Delta rbsR$ -Mutante schien sogar verminderte RybB-Mengen aufzuweisen (Abb. 33B).

Die biofilmfördernde Funktion der untersuchten Genprodukte besteht weder darin, der CpxR-vermittelten negativen Transkriptionskontrolle von *csgD* entgegenzuwirken, noch die Expression von RprA und RybB zu inhibieren und so die *csgD*-Translation zu begünstigen.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse von z. T. neu identifizierten biofilmfördernden Genen konnte deren Wirkungsposition innerhalb der Biofilmmatrix-Kontrollkaskade nicht abschließend geklärt werden. Lediglich für DgcE, YjdA und YjcZ konnte bestätigt werden, dass diese über das PdeR/DgcM/MlrA-Modul in die c-di-GMP-vermittelte *csgD*-Expression eingreifen. Während die Wirkposition von YdcI aufgrund unveränderter *CsgD*- und *csgB::lacZ*-Expressionen der Curli-Expression nachgeschaltet sein muss, besteht die biofilmfördernde Beteiligung von RbsK, RbsR, YieP und PuuR vermutlich in der *csgD*-Expressionskontrolle. Diese ist sowohl unabhängig von PdeR/DgcM/MlrA als auch von den bei Zellhüllstress exprimierten *csgD*-Regulatoren CpxR, RprA und RybB (vgl. Diskussion 5.6).

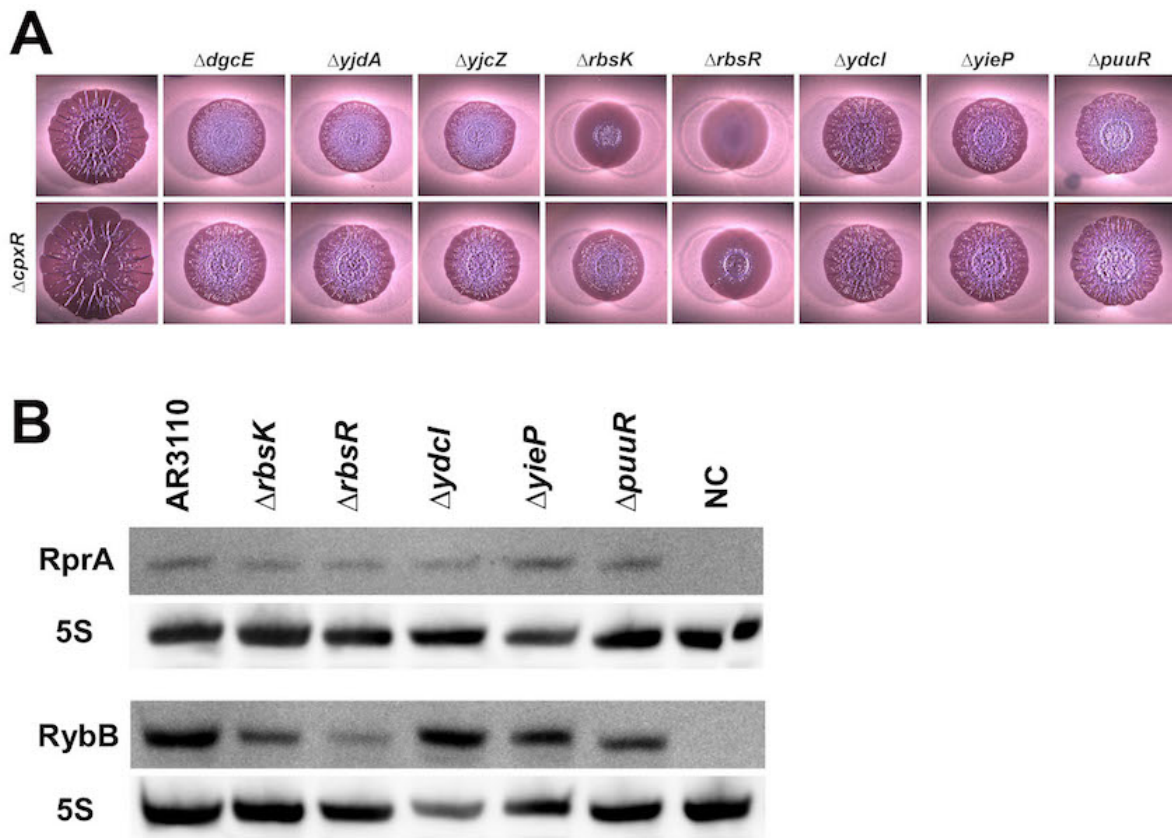


Abb. 33: Keines der identifizierten Genprodukte greift in die Zellhüllstress-vermittelte Inhibition der *csgD*-Expression ein. (A) Makrokolonien von AR3110 (oben links) sowie Derivaten wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. CpxR wird bei Zellhüllstress aktiviert und inhibiert die *csgD*-Transkription. Sämtliche Mutationen in einem $\Delta cpxR$ -Stammhintergrund zeigten noch einen negativen Effekt auf die Biofilmbildung. Die Genprodukte wirken demnach nicht auf den Cpx-Signaltransduktionsweg ein. **(B)** Northernblotanalysen zur Detektion von zellulären Mengen der sRNAs RprA und RybB erfolgten aus AR3110 und Derivaten nach Wachstum in LB bei 28 °C bis zu einer $OD_{578} = 3,5 - 4$. 4 μ g an isolierter Gesamt-RNA wurde aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mithilfe von entsprechenden DIG-markierten DNA-Sonden. Die zusätzliche Detektion von 5S rRNA diente als Ladekontrolle. NC bezeichnet die Negativkontrollen $\Delta rprA$ bzw. $\Delta rybB$. RprA und RybB werden als Antwort auf Zellhüllstress durch das Rcs-System bzw. σ^E aktiviert und inhibieren die *csgD*-Translation. Keine der Mutanten wies erhöhte Mengen an RprA oder RybB auf. Die Genprodukte greifen demnach nicht auf Ebene dieser sRNAs in die *csgD*-Expression ein.

4.3 Einfluss von mechanischen, durch Flagellenverknötung bewirkten Signalen auf die Biofilmmatrixsynthese

Eine vorangegangene Studie von Serra *et al.* (2013b) konnte zeigen, dass die Makrokolonie eines *E. coli* K12 W3110-Stammes, der aufgrund der Deletion des Motorproteins MotA in seiner Flagellenrotation gestört ist (W3110 $\Delta motA$), kein charakteristisches Ringmuster ausbildet und somit weniger Curli-Fimbrien aufweist. Ein solcher Stamm zeichnet sich zudem durch ein deutlich verringertes Netzwerk an ineinander verknöteten Flagellen am Boden und an den Rändern der Kolonie aus, wobei sich die Flagellen in einen spannungsfreien Zustand aufrollen (Serra *et al.*, 2013b).

Dieser Befund warf die Frage auf, ob die flagellare Verknötung und dadurch bedingte Zugkräfte innerhalb der nährstoffreichen Biofilmzonen ein mechanisches Signal darstellt, welches für die Biofilmmatrixsynthese in oberen Schichten vonnöten ist. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden *motA*-Deletionsmutanten als Studienobjekte herangezogen, die aufgrund ihrer gestörten Flagellenrotation und der daraus resultierenden verringerten Flagellenverknötungen auch verminderte mechanische Zugkräfte aufweisen.

4.3.1 Rotationsbedingte flagellare Verknötungen stellen ein Signal für die Matrixproduktion dar

Zunächst wurde eine Deletion des *motA*-Gens in dem Curli- und pEtN-Cellulose-exprimierenden AR3110-Stamm erzeugt. Anhand von Makrokolonie-Experimenten wurde der Effekt dieser Mutation mit dem innerhalb des W3110-Stammes, der lediglich Curli-Fimbrien produziert, verglichen. Es wurde deutlich, dass die Deletion von *motA* sowohl im AR3110- als auch im W3110-Stammhintergrund einen reduzierenden Effekt auf die Biofilmbildung ausübt, wobei die Auswirkung im W3110 deutlicher zutage trat (Abb. 34A, $\Delta motA$).

Um zu bestätigen, dass diese reduzierten Phänotypen auf verminderter Matrixproduktion beruhen, wurde die Expression einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion untersucht, welche als direkter Indikator für die Expression der Curli-Struktureinheiten dient. Da rotationsbedingte flagellare Verknötungen in Flüssig- und Festmedium unterschiedliche Bedeutungen haben könnten, wurde die *csgB::lacZ*-Expression sowohl entlang der Wachstumskurve in Flüssigmedium untersucht als auch in Kolonien auf Festagar (Abb. 34B & C).

Unter beiden Bedingungen war im Vergleich zum Wildtypstamm eine deutlich verminderte *csgB::lacZ*-Expression für die *motA*-Deletionsmutanten zu verzeichnen. In Flüssigmedium wurde zwar eine stetig zunehmende Expression ab dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase beobachtet, diese war jedoch nach 28 h (üN) im Vergleich zum Wildtypen

etwa 3-fach reduziert (Abb. 34B). Auf festem Agar war die $\Delta motA$ -bedingte Reduktion der *csgB::lacZ*-Expression in eintägigen Kolonien (1 d) stärker ausgeprägt als in zweitägigen Kolonien (2 d). Aber auch nach zwei Tagen war eine im Vergleich zum Wildtypstamm klar verminderte Expression auszumachen (Abb. 34C).

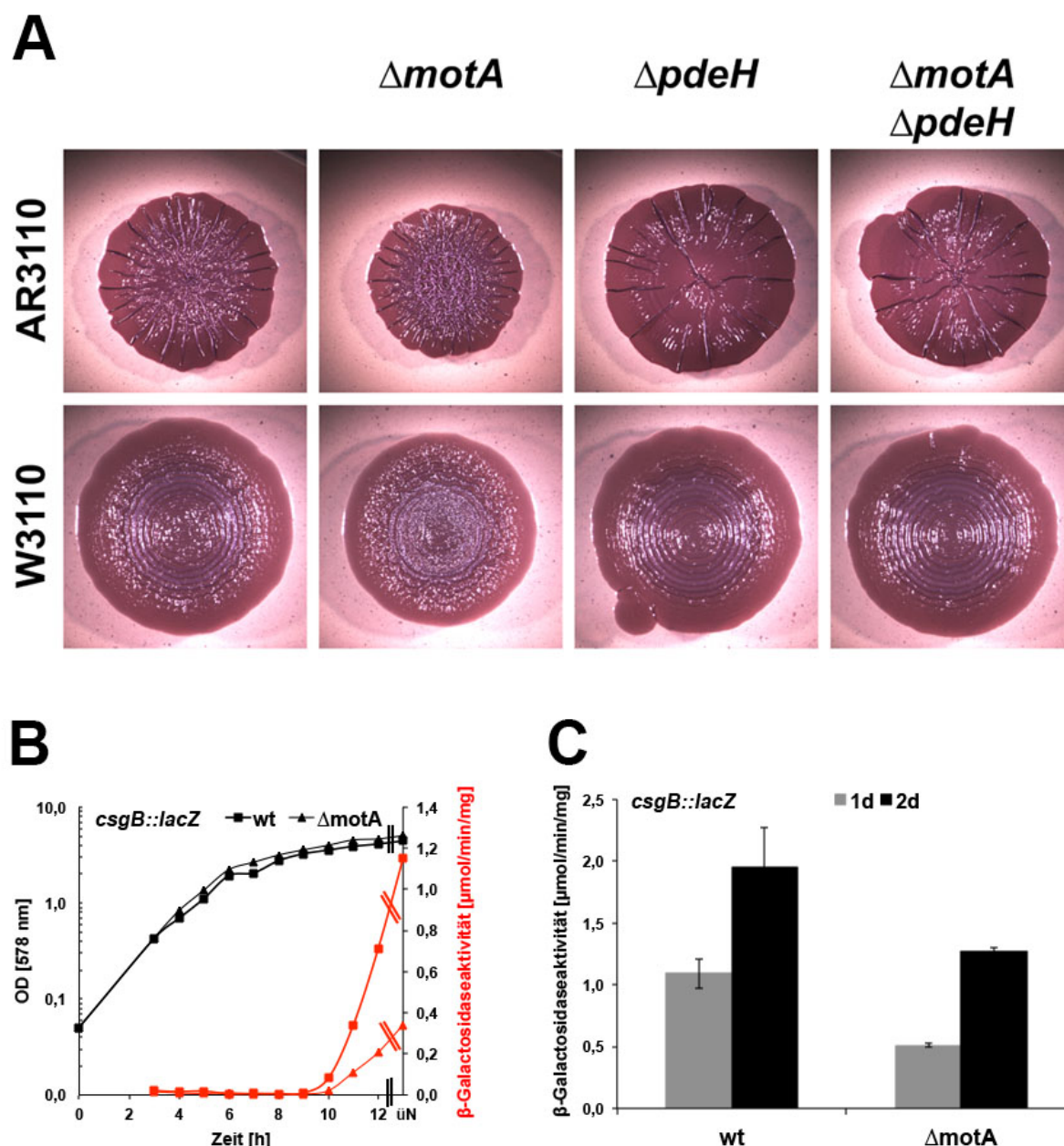


Abb. 34: Die Inhibition der Flagellenrotation ($\Delta motA$) resultiert in verminderter Biofilmmatrixproduktion, die durch die Deletion von *pdeH* kompensiert werden kann. (A) Makrokolonien von AR3110 (Curli- und pEtN-Cellulosesynthese) und Derivaten (oben) sowie W3110 (Curli-Synthese) und Derivaten (unten) wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. **(B)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion in W3110 $\Delta lac(I-A)$ (wt) und dem Derivat $\Delta motA$ entlang der Wachstumskurve in LB bei 28 °C. Der Übernachtswert (üN) entspricht 28 h Wachstum. **(C)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion in W3110 $\Delta lac(I-A)$ (wt) und dem Derivat $\Delta motA$ aus 1 d und 2 d alten Makrokolonien. Die Kolonien wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf LBnoS-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C erzeugt. Die Daten resultieren aus Triplikaten.

Die reduzierte Biofilmbildung, die durch eine *motA*-Deletion zustande kam, konnte durch die zusätzliche Deletion von *pdeH* nicht nur aufgehoben werden, sondern erzeugte Kolonien, die *pdeH*-Einzeldelentionsmutanten glichen (Abb. 34A, $\Delta pdeH$ & $\Delta motA\Delta pdeH$). Da die Deletion der Master-PDE *pdeH* bekanntermaßen eine stark erhöhte zelluläre c-di-GMP-Konzentration nach sich zieht (Sarenko et al., 2017), ist davon auszugehen, dass der reduzierten Matrixexpression einer *motA*-Deletionsmutante durch erhöhte c-di-GMP-Mengen entgegengewirkt werden kann.

Es konnte bestätigt werden, dass flagellare Verknötungen, die durch Flagellenrotation auf Festmedium entstehen, bei der Matrixsynthese und somit Biofilmbildung eine Rolle spielen. Weiterhin lassen die Daten die Vermutung zu, dass dabei ein mechanisches Signal generiert werden könnte, welches in die c-di-GMP-vermittelte Signaltransduktion eingreift. Wäre dies der Fall, müsste solch ein Signal in der Aktivitätskontrolle ein oder mehrerer DGCs bzw. PDEs resultieren.

4.3.2 Nimmt DgcE verknötete Flagellen als Signal wahr?

Wie in Kapitel 4.1 eingehend erläutert wurde, nimmt die DGC DgcE eine entscheidende Rolle beim Übergang von der flagellaren hin zur matrixproduzierenden Signalkaskade ein und ist somit für die Biofilmbildung essentiell. Über die sensorische MASE1-Domäne ist DgcE in der inneren Zellmembran verankert, wobei das wahrgenommene Signal der MASE1-Domäne zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt war. DgcE erschien demnach als ein naheliegender Kandidat, der an der Wahrnehmung eines durch Flagellenzug verursachten mechanischen Signals beteiligt sein könnte, womöglich sogar über eine direkte Assoziation mit dem flagellaren Basalkörper, der ebenfalls in der Membran verankert ist.

Da zudem bereits für andere Spezies, wie z. B. *P. aeruginosa* und *C. crescentus*, beschrieben ist, dass die Adhäsion an Oberflächen mit ansteigenden c-di-GMP-Mengen durch erhöhte Aktivitäten bestimmter DGCs einher geht (Hug et al., 2017; O'Toole and Wong, 2016), sollte DgcE auf eine ähnliche Rolle in *E. coli* näher untersucht werden.

4.3.2.1 DgcE beeinflusst die Biofilmmatrixsynthese stärker auf Fest- als in Flüssigmedium

Zunächst wurde getestet, ob DgcE einen spezifischen Einfluss auf die Matrixsynthese auf Festmedium hat, wo es verstärkt zu flagellaren Verflechtungen kommt.

Zu diesem Zweck wurde die Curli-Expression einer *dgcE*-Deletionsmutante anhand einer *csgB::lacZ*-Reportergenexpression sowohl in Flüssig- als auch auf Festmedium verfolgt und zudem mit der einer *dgcM*-Deletionsmutante verglichen (Abb. 35). DgcM ist eine lösliche

DGC, welche über direkte Proteininteraktionen mit PdeR und MlrA die *csgD*-Expression reguliert und dabei eine aktivierende Rolle einnimmt (Lindenberg et al., 2013).

Die Deletion beider Gene ($\Delta dgcE\Delta dgcM$) resultierte erwartungsgemäß stets in dem kompletten Verlust von *csgB::lacZ*- und somit Curli-Expression, da die für die MlrA-vermittelte *csgD*-Expression nötigen Aktivatoren fehlten. Für $\Delta dgcE$ wurde in Flüssigmedium nach 28 h eine spezifische β -Galaktosidaseaktivität gemessen, die etwa 35 % der Wildtypexpression entsprach (Abb. 35A), wohingegen die Deletion von *dgcE* auf Festmedium in lediglich 20-23 % der Wildtypexpression resultierte (Abb. 35B).

Im Vergleich zu einer *dgcM*-Deletionsmutante wurde zudem deutlich, dass sich die Abwesenheit von DgcE v. a. nach 2 d auf Festmedium drastischer auf die Curli-Expression auswirkte als die von DgcM (Abb. 35B). In Flüssigmedium hingegen spielte DgcM eine entscheidendere Rolle, da seine Deletion keine *csgB::lacZ*-Expression zuließ, während bei einer *dgcE*-Deletion noch etwas Expression zu verzeichnen war (Abb. 35A).

Diese Daten zeigen, dass DgcE für die Expression von Biofilmmatrix auf festem Untergrund von größerer Bedeutung ist als in Flüssigmedium.

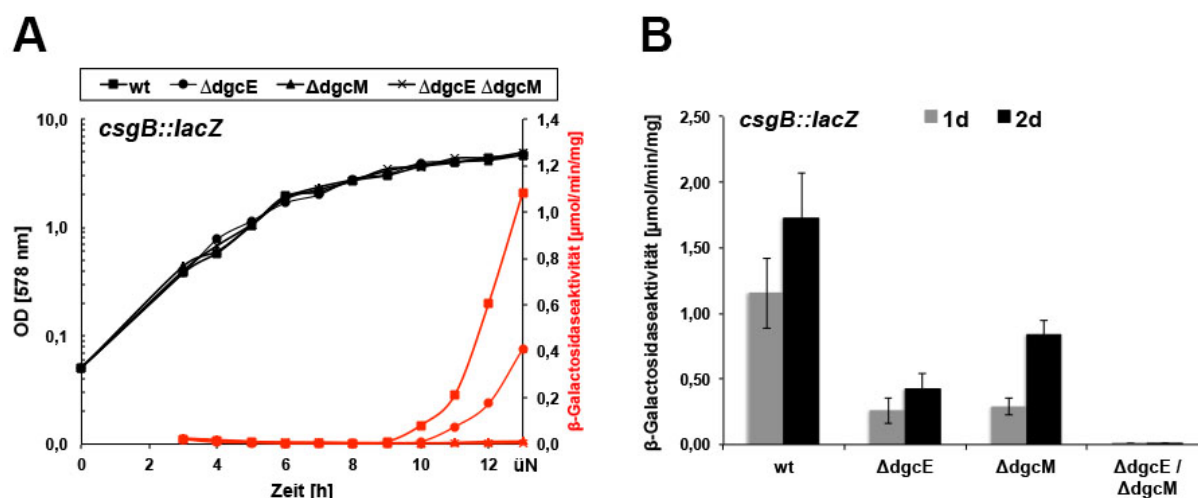


Abb. 35: DgcE ist für die Curli-Expression auf Festmedium von größerer Bedeutung als in Flüssigmedium. (A) Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion in W3110 $\Delta lac(I-A)$ (wt) und Derivaten entlang der Wachstumskurve in LB bei 28 °C. Der Übernachtswert (ÜN) entspricht 28 h Wachstum. **(B)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion aus 1 d und 2 d alten Makrokolonien von W3110 $\Delta lac(I-A)$ (wt) und Derivaten. Die Kolonien wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf LBnoS-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C erzeugt. Die Daten resultieren aus Triplikaten.

4.3.2.2 DgcE ist nicht an der Wahrnehmung flagellarer Verknötungen beteiligt

Wenn flagellare Verknötungen ein von DgcE wahrgenommenes Signal generieren, wodurch letztlich die Matrixsynthese aktiviert wird, dann dürfte sich der reduzierende Effekt auf die Matrixexpression, der für *motA*- und *dgcE*-Deletionsmutanten beobachtet wurde, in einer Doppelmutante ($\Delta motA \Delta dgcE$) nicht addieren. Vielmehr müsste sich eine Doppelmutante stets wie eine *dgcE*-Einzeldelentionsmutante verhalten, wenn die DgcE-Aktivität durch Flagellenrotation und -verknötung bedingt ist.

Anhand von Makrokolonien sowie der *csgB::lacZ*-Expression in $\Delta motA$ -, $\Delta dgcE$ - und $\Delta motA \Delta dgcE$ -Mutanten wurde jedoch deutlich, dass dies nicht der Fall ist. Im W3110-Stammhintergrund war zwar keine eindeutige Reduktion der Matrixexpression für die Doppelmutante $\Delta motA \Delta dgcE$ im Vergleich zu den Einzeldelentionsmutanten auszumachen. Die gleichen Mutationen im AR3110-Hintergrund zeigten jedoch, dass die Doppelmutante ($\Delta motA \Delta dgcE$) reduzierter in ihrer Matrixproduktion (Curli und pEtN-Cellulose) war als eine $\Delta dgcE$ -Mutante (Abb. 36A). Bestätigt wurde dieser Befund anhand von *csgB::lacZ*-Expressionen, die in einer $\Delta motA \Delta dgcE$ -Doppelmutante sowohl in Flüssig- als auch auf Festmedium stets am geringsten ausfielen (Abb. 36B & C). Eine inhibierte Flagellenrotation hatte demnach auch bei Abwesenheit von DgcE noch Auswirkungen.

Gleiche Beobachtungen wurden bezüglich der DgcE-aktivierenden Proteine YjdA und YjcZ (vgl. 4.1.3) gemacht, die ebenfalls unabhängig von MotA-vermittelter Flagellenrotation wirkten (Abb. 36A).

Zudem konnte mithilfe von *in vivo* Studien keinerlei Interaktion zwischen DgcE und MotA ausgemacht werden (Abb. 36D), sodass DgcE zumindest nicht über dieses Motorprotein mit dem flagellaren Basalkörper assoziiert ist. In der Bachelorarbeit von Diego Penilla (2018) konnten zudem keinerlei Interaktionen zwischen DgcE und den flagellaren Komponenten FliF, FliG und FliM beobachtet werden.

Ein Einfluss der Rotation und somit verstärkte Verknötung von Flagellen auf die Expression und Proteolyse von DgcE (vgl. 4.1.2) konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, da sich das Degradationsmuster von DgcE::3xFLAG auch in einer *motA*-Deletionsmutante ($\Delta motA$) nicht veränderte (Abb. 36E).

Es kann festgehalten werden, dass DgcE kein direkter Sensor für flagellare Verknötungen ist und ein solches mechanisches Signal demnach nicht direkt aktivierend auf DgcE-vermittelte *csgD*-Expression wirkt (vgl. Diskussion 5.7).

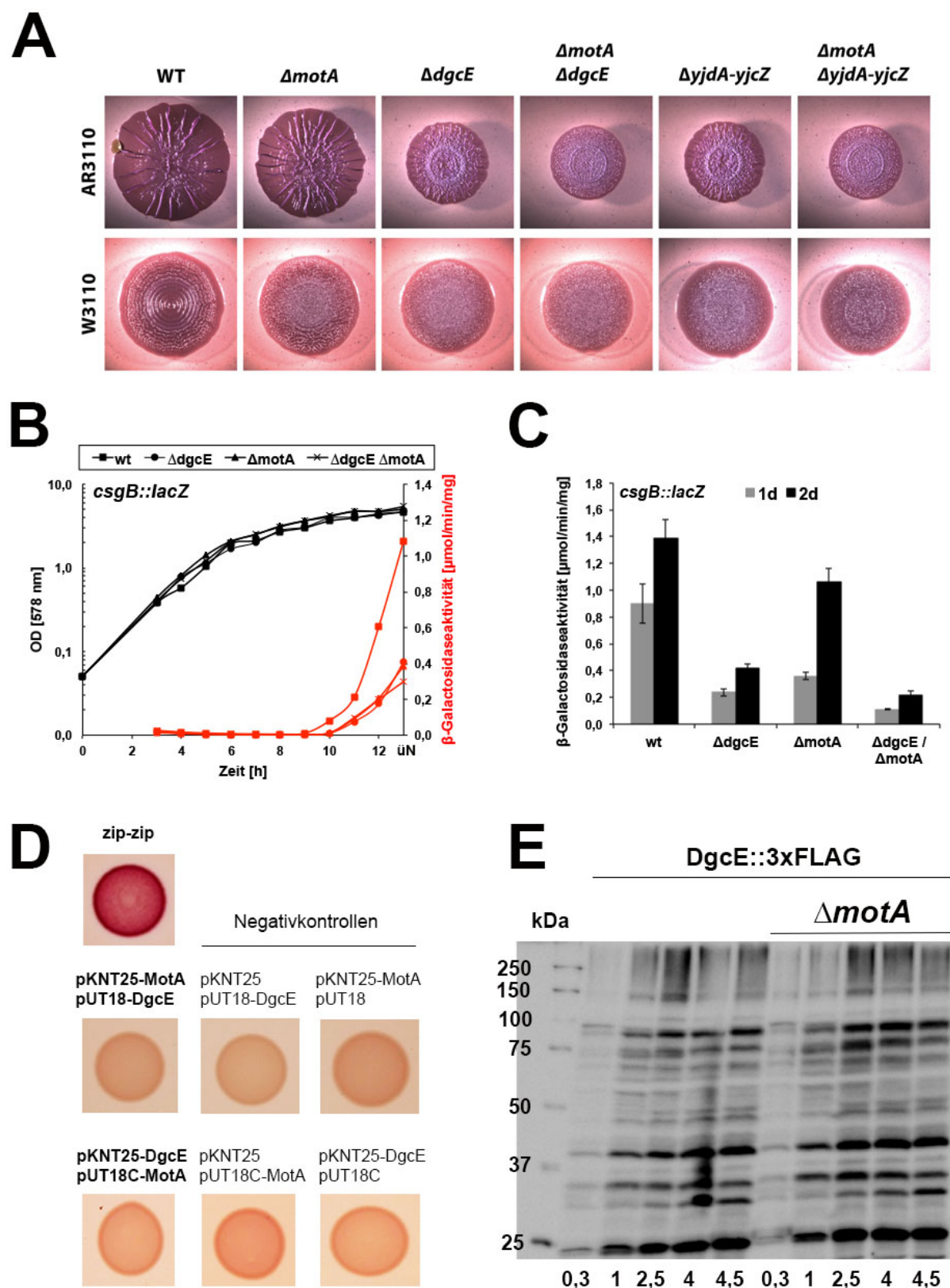


Abb. 36: DgcE agiert unabhängig von rotationsbedingter Flagellenverknötung. (A) Makrokolonien von AR3110 und Derivaten (oben) sowie W3110 und Derivaten (unten) wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf Kongorot-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C für 5 d erzeugt. **(B)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion in W3110 Δ *lac(I-A)*-Derivaten entlang der Wachstumskurve in LB bei 28 °C. Der Übernachtswert (üN) entspricht 28 h Wachstum. **(C)** Expression einer *csgB::lacZ*-Reporterfusion in 1 d und 2 d alten Makrokolonien von W3110 Δ *lac(I-A)*-Derivaten. Die Makrokolonien wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtskultur auf LBnoS-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C erzeugt. Die Daten resultieren aus Triplikaten. **(D)** In

in vivo Protein-Protein-Interaktionsstudien nach Karimova *et al.* (1998) wurden mit Fusionsproteinen durchgeführt, die am C-Terminus die CyaA-Untereinheiten T25 bzw. T18 aufwiesen und von pKNT25 bzw. pUT18 exprimiert wurden, oder am N-Terminus T18 aufwiesen und von pUT18C exprimiert wurden. Die Co-Expression fand in W3110 $\Delta cyaA$ statt, resultierende Transformanten wurden in H₂O resuspendiert und 5 μ l der Suspension auf MacConkey-Platten (+1 % Maltose, + Amp, + Kan) bei 28 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte nach 1 d. Bei einer Interaktion wird die CyaA-Aktivität wiederhergestellt, was die Verwertung von Maltose ermöglicht und aufgrund der Ansäuerung zu einer Rotfärbung führt. Die Interaktion des Leucin-Zippers des Hefeproteins GCN4 (zip-zip) diente als Positivkontrolle, Ansätze mit Leerplasmiden als Negativkontrollen. **(E)** Immunoblot zur Detektion von DgcE::3xFLAG in unterschiedlichen Wachstumsphasen mithilfe eines spezifischen anti-3xFLAG-Antikörpers. Das Wachstum eines W3110 *dgcE*::3xFLAG Stammes und dem Derivat $\Delta motA$ erfolgte in LB bei 28 °C. Proben wurden bei einer OD₅₇₈ = 0,3, 1, 2,5, 4 und 4,5 genommen. Sichtbar sind lediglich solche Fragmente, die den C-terminalen 3xFLAG-tag beinhalten.

4.3.3 Flagellare Verknötungen resultieren in reduzierter *pdeH*-Expression

Alternativ zu der Möglichkeit, dass flagellare Verknötungen ein Signal zur Aktivierung einer DGC darstellen, kommt die Inaktivierung oder reduzierte Expression einer PDE für c-di-GMP-vermittelte *csgD*-Expression in Frage, wobei PdeH als globale Master-PDE der wahrscheinlichste Kandidat ist.

In Kapitel 4.3.1 wurde bereits gezeigt, dass der matrixüberproduzierende Phänotyp einer $\Delta pdeH$ -Makrokolonie auch bei einer zusätzlichen Deletion von *motA* erhalten blieb (vgl. Abb. 34A), was konsistent damit wäre, dass ein durch Flagellenverknötung generiertes Signal die PdeH-Expression oder -Aktivität herunterreguliert. Da die Expression von *pdeH* unter flagellarer Kontrolle steht, rückte diese Kaskade in den Fokus weiterer Analysen. Für die drei flagellaren Operonklassen wurde die Expression von jeweils einem Vertreter in Flüssig- und auf Festmedium (Kolonien) analysiert, wobei der Einfluss der MotA-vermittelten Flagellenrotation untersucht werden sollte. Hierfür kamen Reportergenfusionen zum Einsatz, wobei die Expression von *flhDC*::*lacZ* das Klasse 1, *fliA*::*lacZ* das Klasse 2 und *pdeH*::*lacZ* das Klasse 3 Operon repräsentierte (Abb. 37).

In Flüssigmedium war erwartungsgemäß v. a. während der postexponentiellen Wachstumsphase eine erhöhte Expression der drei untersuchten flagellaren Gene zu beobachten [vgl. auch (Barembuch and Hengge, 2007)], welche durch die Inhibition der Flagellenrotation ($\Delta motA$) kaum verändert wurde. Nach 28 h (üN) sank die spezifische β -Galaktosidaseaktivität stets auf einen Wert von 0,2 μ mol/min/mg ab (Abb. 37 oben).

In Kolonien hingegen war die Expression von *pdeH*::*lacZ* in einer $\Delta motA$ -Mutante fast doppelt so hoch wie im wildtypischen Stammhintergrund. Die *flhDC*::*lacZ*-Expression war bei Abwesenheit von *motA* ebenfalls leicht erhöht, ein Unterschied wurde allerdings erst nach zwei Tagen deutlich. Die *fliA*::*lacZ*-Expression blieb auch in Kolonien unverändert (Abb. 37 unten).

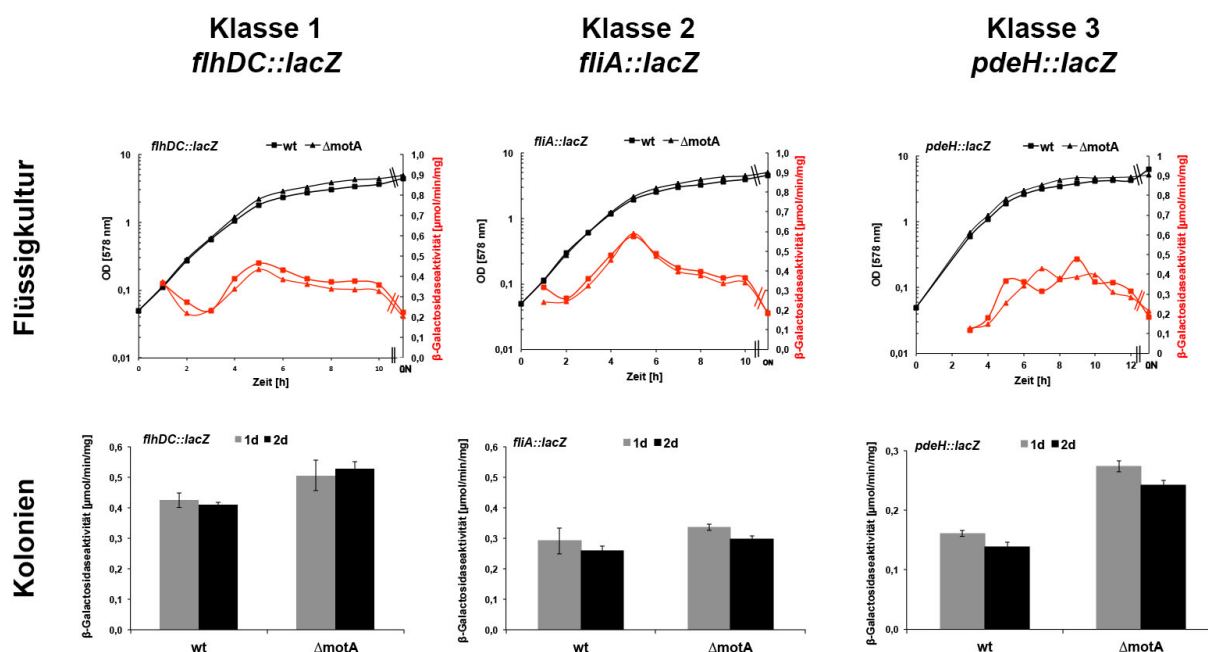


Abb. 37: Die Inhibition der Flagellenrotation ($\Delta motA$) resultiert spezifisch auf Festmedium in erhöhter *pdeH*-Expression. Die Expressionsanalyse von flagellaren Genen der Klasse 1, 2 und 3 anhand von *flhDC::lacZ*-, *fliA::lacZ*- und *pdeH::lacZ*-Reportergernefusionen in W3110 $\Delta lac(I-A)$ (wt) sowie dem $\Delta motA$ -Derivat erfolgte zum einen entlang der Wachstumskurve in LB bei 28 °C (Flüssigkultur) und zum anderen in 1 d und 2 d alten Makrokolonien der gleichen Stämme (Kolonien). Der Übernachtwert (üN) entspricht 28 h Wachstum. Die Kolonien wurden durch das Tropfen von 5 μ l Übernachtkultur auf LBnoS-Platten und anschließender Inkubation bei 28 °C erzeugt. Die Daten bezüglich der Kolonien resultieren aus Triplikaten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte spezifisch für das Wachstum auf Festmedium ein Zusammenhang zwischen rotationsbedingter Flagellenverknötung in der unteren nährstoffaufliegenden Schicht von *E. coli* K12 Makrokolonien und einer damit einhergehenden reduzierten *pdeH*-Expression aufgezeigt werden. Dies resultiert vermutlich in erhöhten zellulären c-di-GMP-Mengen, wodurch schließlich die Synthese von Matrixkomponenten begünstigt werden könnte (vgl. Diskussion 5.7).

5 Diskussion

5.1 DgcE integriert multiple Signale über diverse Domänen

Das Multidomänenprotein DgcE hat eine entscheidende Rolle bei der c-di-GMP-vermittelten *csgD*-Expression und folglich Biofilmbildung inne, indem es das auf lokaler Signaltransduktion agierende PdeR/DgcM/MlrA-Modul reguliert und dabei dem inhibitorischen Effekt von PdeR auf DgcM/MlrA entgegenwirkt. Mit sechs Domänen (TM/MASE1-PAS₃-GGDEF-EAL_{deg}) ist DgcE das strukturell komplexeste GGDEF-/EAL-Domänenprotein in *E. coli* K12 (Lindenberg et al., 2013; Pesavento et al., 2008; Povolotsky and Hengge, 2016). Die Domänenanordnung PAS-GGDEF-EAL ist weit verbreitet unter den c-di-GMP-metabolisierenden Proteinen, wobei zumeist entweder GGDEF-vermittelte Diguanylatzyklase(DGC)-Aktivität oder EAL-vermittelte Phosphodiesterase(PDE)-Aktivität besteht (Römling et al., 2013). DgcE verfügt neben dieser Kernstruktur einerseits über zwei weitere PAS/PAC-Domänen und andererseits über eine sensorische N-terminale membrangebundene MASE1-Domäne. Diese Arbeit zeigt, dass DgcE zu einer komplexen sowie fein regulierten Signalintegration und -transduktion befähigt ist. Die hier erlangten Erkenntnisse bezüglich der Rolle einzelner Domänen werden im Folgenden diskutiert.

5.1.1 Bedeutung der GGDEF- und PAS-Domänen für die DGC-Aktivität und Dimerisierung

DgcE verfügt über DGC-Aktivität und trägt als Hauptantagonist der Master-PDE PdeH maßgeblich zu der c-di-GMP-vermittelten Biofilmmatrixsynthese bei Eintritt in die Stationärphase bei (Sarenko et al., 2017).

Anhand einer *dgcE*^{GGAAF}-Mutante, die aufgrund einer degenerierten GGDEF-Domäne kein c-di-GMP synthetisieren kann und in ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung genauso gestört war wie eine komplette *dgcE*-Deletionsmutante (Abb. 7 & 29), wurde in dieser Arbeit verdeutlicht, dass der regulatorische Effekt von DgcE auf das PdeR/DgcM/MlrA-Modul u. a. von DgcE-generiertem c-di-GMP abhängt. Dieses Erkenntnis war erwartungsgemäß, bedurfte aber dennoch einer experimentellen Bestätigung. Im Gegensatz zu DgcE ist die DGC-Aktivität von DgcM nämlich nicht essentiell für die Aktivierung von MlrA und die *csgD*-Expression, sondern beruht vornehmlich auf Protein-Interaktionen (Lindenberg et al., 2013).

Die GGDEF-Domäne von DgcE verfügt neben einem aktiven Zentrum (A-site) auch ein inhibitorisches Zentrum (I-site). In dieser Arbeit wurden diesbezüglich keine Untersuchungen vorgenommen, aber eine allosterische Produktinhibition durch die I-site erscheint wahrscheinlich. So könnte die DgcE-vermittelte c-di-GMP-Produktion zusätzlich reguliert werden.

Um c-di-GMP synthetisieren zu können bedarf es der Dimerisierung von DGCs. Häufig wird solch eine Dimerisierung in Abhängigkeit verschiedener Signale durch assoziierte sensorische Domänen vermittelt (Chan et al., 2004; Schirmer, 2016; Schirmer and Jenal, 2009). Die Dimerisierung der DGCs PleD aus *C. crescentus* und WspR aus *P. aeruginosa* wird beispielsweise durch ihre Receiver-Domänen (Rec) im Zuge von Phosphorylierung erleichtert (De et al., 2009; Wassmann et al., 2007). Auch PAS-Domänen, die häufig N-terminal von GGDEF-Domänen lokalisiert sind, gelten als universale Signalsensoren und können Protein-Protein-Interaktionen sowie Dimerisierungsprozesse vermitteln (Möglich et al., 2009; Schirmer, 2016).

Diese Arbeit hat gezeigt, dass ein vergleichbarer Mechanismus an der Aktivitätsregulation von DgcE beteiligt ist, wobei anhand von *in vivo* Interaktionsstudien nach Karimova *et al.* (1998) verdeutlicht wurde, dass die Dimerisierung von DgcE nicht durch die GGDEF-, sondern vornehmlich über die PAS-Domänen vermittelt wird (Abb. 8). Somit ist die PAS₃-Region maßgeblich daran beteiligt, die GTP-bindenden GGDEF-Domänen in unmittelbare Nähe zueinander zu bringen und eine stabilisierende Wirkung auf die c-di-GMP-Synthese auszuüben. Dieser Befund deckt sich mit Erkenntnissen einer groß angelegten Studie, die zeigen konnte, dass in *E. coli* K12 die meisten GGDEF-Domänen von DGCs nicht alleine dimerisieren. Dabei konnte unter Verwendung der *in vivo* Interaktionsmethode Bacterio-Match®II für die GGDEF-Domäne von DgcE ebenfalls keine Dimerisierung festgestellt werden (Sarenko et al., 2017).

Da in dieser Promotionsarbeit auch eine DgcE^{ΔPAS3}-Variante eine leichte Dimerisierung anzeigte (Abb. 8), müssen neben den PAS- auch weitere Domänen am Dimerisierungsprozess beteiligt sein. Das Fehlen der TM- oder degenerierten EAL-Domäne (EAL_{deg}) führte jedoch zu starker Dimerisierung, was keine Notwendigkeit dieser Domänen für die DgcE-Dimerisierung anzeigte. Für eine DgcE^{ΔTM}-Variante könnte die starke Dimerisierung im Gegensatz zu membrangebundenen Varianten schlicht an vereinfachter Interaktion aufgrund freier Diffusion im Cytoplasma liegen. Außerdem hat sich im Laufe dieser Arbeit gezeigt, dass lösliches DgcE weitaus stabiler in der Zelle vorliegt, wohingegen membrangebundene Varianten einer ständigen Proteolyse ausgesetzt sind (Abb. 10 & 13). Somit dürften für DgcE^{ΔTM} vermehrte Interaktionen zustande kommen, die jedoch nicht an eine erhöhte DgcE-Aktivität gekoppelt sind, da sich eine chromosomale *dgcE*^{ΔTM}-Mutante verhielt wie eine *dgcE*-Deletionsmutante (Abb. 7).

Interessanterweise existieren quantitative Interaktionsdaten, die mit der Bacterio-Match®II-Methode erhoben wurden und Hinweise darauf liefern, dass die C-terminale EAL_{deg}-Domäne von DgcE neben den PAS-Domänen ebenfalls zur Dimerisierung befähigt ist (O. Sarenko & R. Hengge, unveröffentlicht). Dies steht im Gegensatz zu den hier gezeigten qualitativen Daten mithilfe der Methode nach Karimova *et al.* (1998). Die Bacterio-Match®II-Methode

basiert auf der interaktionsvermittelten Transkriptionsinitiation eines Reportergens, wobei die zu testenden Proteine an eine Untereinheit der RNA-Polymerase sowie den Lambda-Repressor *ci* fusioniert werden (Dove and Hochschild, 2004). Diese Methode ist daher ausschließlich für lösliche Proteine geeignet und wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Membranständigkeit von DgcE nicht verwendet. Die einzelne EAL_{deg}-Domäne ist allerdings löslich, weshalb sie mit der Bacterio-Match®II-Methode hinsichtlich ihrer Interaktionsfähigkeit analysiert werden kann. Da quantitative Daten in der Regel aussagekräftiger sind als qualitative und Interaktionsstudien auch falsch-negative Ergebnisse liefern können, besteht durchaus die Möglichkeit einer EAL_{deg}-unabhängigen (siehe DgcE^{ΔEAL}-Dimerisierung in dieser Arbeit) sowie einer EAL_{deg}-beteiligten (O. Sarenko & R. Hengge, unveröffentlicht) DgcE-Dimerisierung (vgl. 5.1.2). Mithilfe von *in vitro* Pulldown-Experimenten könnte diesbezüglich Klarheit geschaffen werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der aktivierende Einfluss der GGDEF- und PAS-Domänen auf die DgcE-vermittelte *csgD*-Expression in ihrer DGC-Aktivität (GGDEF) und der dafür erforderlichen Dimerisierung von DgcE (über PAS₃) liegt.

Es stellt sich dennoch die Frage nach der Notwendigkeit mehrerer PAS-Domänen. Kürzlich wurde demonstriert, dass die drei PAS-Domänen der Kinase KinA aus *B. subtilis* unterschiedlich zur Tetramerisierung und Autokinaseaktivität beitragen (Kiehler et al., 2017). In weiterführenden Studien könnte eine differenzierte Analyse der einzelnen PAS-Domänen von DgcE ebenfalls Aufschluss darüber geben, ob tatsächlich alle drei Domänen für die Di- bzw. Oligomerisierung (vgl. 5.1.2) notwendig sind und ob eventuell ein durch die PAS-Region integriertes spezifisches Signal, wie z. B. Ligandenbindung, für diesen Prozess und folglich die DgcE-Aktivität erforderlich ist.

5.1.2 EAL_{deg}-vermittelte Inhibition der aktivierenden Di- bzw. Oligomerisierung

Im Gegensatz zu *dgcE*^{GGAFF}-, *dgcE*^{ΔTM}- und *dgcE*^{ΔPAS3}-Mutanten zeigte eine *dgcE*^{ΔEAL}-Mutante stark erhöhte Matrix- und Biofilmproduktion (Abb. 7). Der C-terminalen degenerierten EAL_{deg}-Domäne konnte in dieser Arbeit demnach eine inhibitorische Rolle für die DgcE-vermittelte *csgD*-Expression nachgewiesen werden.

Da die Expression von plasmidkodiertem *dgcE*^{ΔEAL::6His} in stark erhöhten zellulären c-di-GMP-Mengen resultierte (Abb. 29B), liegt intuitiv die Vermutung einer restlichen PDE-Aktivität seitens der EAL_{deg}-Domäne nahe, wodurch GGDEF-produziertes c-di-GMP abgebaut wird und beim Fehlen der EAL_{deg}-Domäne c-di-GMP vermehrt in der Zelle akkumuliert. Aufgrund von fehlenden essentiellen Aminosäuren, die für die Bindung und den katalytischen Abbau von c-di-GMP nötig sind (Rao et al., 2008; Sommerfeldt et al., 2009), ist von einer EAL_{deg}-vermittelten PDE-Aktivität jedoch nicht auszugehen. Dies sollte künftig dennoch experimentell mithilfe einer *in vitro* PDE-Aktivitätsmessung bewiesen werden.

Weitaus wahrscheinlicher ist es, dass die EAL_{deg}-Domäne negativ in die DGC-Aktivität von DgcE eingreift. Im Rahmen der Immunoblot-basierten Proteolyseuntersuchung war sowohl für chromosomal kodiertes DgcE^{ΔEAL}::3xFLAG (Abb. 10) als auch für pCAB18-kodiertes DgcE^{ΔEAL}::6His (Abb. 13) stets die Akkumulierung einer Bande zu beobachten, die die Größe eines Dimers überschritt und auf Oligomerisierung hindeutete. Auch schien plasmidkodiertes DgcE^{ΔEAL}::6His im Vergleich zu den anderen DgcE-Varianten vermehrt in der Zelle vorzuliegen (Abb. 13), was auf einen Oligomer-vermittelten Schutz vor proteolytischen Angriffen hinweist.

Die beobachtete Oligomerisierung sowie vermehrte c-di-GMP-Synthese ging mit verstärkter Matrixsynthese der chromosomalen *dgcE*^{ΔEAL}-Mutante einher (Abb. 7) und lässt drei Hypothesen zu: (i) Oligomerisiertes DgcE entspricht einer aktiven Form, die c-di-GMP-Synthese erlaubt. Ein solcher Prozess reiht sich in bereits beschriebene Regulationsmechanismen von Diguanylatzyklen ein (Schirmer, 2016). Die Tetramerisierung des Rec-GGDEF-Proteins WspR aus *P. aeruginosa* führt beispielsweise zu einem Anstieg der DGC-Aktivität, welche sogar zusätzlich gesteigert wird durch die Oligomerisierung dieser Tetramere (Huangyutitham et al., 2013). (ii) Die Funktion der EAL_{deg}-Domäne besteht also darin, diese aktivierende Di- bzw. Oligomerisierung von DgcE zu verhindern, wodurch auch die DGC-Aktivität gestört ist. (iii) Als Folge einer verminderten Oligomerisierung könnte DgcE vermehrten Proteolyseangriffen ausgesetzt sein, was ebenfalls in einer verminderten DGC-Aktivität resultiert.

Das Proteolysemuster von DgcE entlang der Wachstumskurve lässt einen verstärkten Abbau der EAL_{deg}-Domäne ab dem Eintritt in die Stationärphase erahnen (Abb. 9 & 11), folglich ab einem Zeitpunkt, der von erhöhter DgcE-Aktivität und Matrixsynthese geprägt ist. Außerdem weisen die Daten auf eine gesonderte Prozessierung dieser Domäne hin, die lediglich einfacher Membranständigkeit ohne den Einfluss der MASE1-Domäne bedarf (Abb. 10). Somit könnte der inhibitorische Einfluss der EAL_{deg}-Domäne einer spezifischen Kontrolle unterliegen, wodurch bislang unbekannte Signale in die DgcE-Regulation einfließen.

Während im Rahmen dieser Arbeit eine regulatorische Funktion der EAL_{deg}-Domäne auf die DGC-Aktivität deutlich wurde, konnte der genaue Mechanismus dieser Aktivitätskontrolle nicht aufgeklärt werden. Die in 5.1.1 diskutierte Möglichkeit einer Dimerisierung der EAL_{deg}-Domäne (O. Sarenko & R. Hengge, unveröffentlicht) bietet jedoch eine vielversprechende Grundlage für weiterführende Studien. So ist es denkbar, dass durch die Dimerisierung der EAL_{deg}-Domäne ein sterischer Zustand bewirkt wird, der es den GGDEF-Domänen nicht erlaubt in eine c-di-GMP-produzierende oligomere Konformation zu gelangen, sodass die Biofilmmatrixsynthese folglich inhibiert wird.

Die Gesamtheit der Befunde zeigt, dass die EAL_{deg}-Domäne eine DgcE-interne Kontrollkomponente darstellt, welche die DgcE-vermittelte c-di-GMP-Synthese negativ

reguliert. Unter Bedingungen, in denen die Matrixsynthese nicht notwendig ist, verhindert sie wahrscheinlich die aktivierende Di- bzw. Oligomerisierung von DgcE. Erst wenn die DGC-Aktivität für die Matrixproduktion an Bedeutung gewinnt, wird dieser inhibitorische Effekt vermehrt aufgehoben (evtl. durch vermehrte Prozessierung der EAL_{deg}-Domäne). Somit gehört die EAL_{deg}-Domäne zu der Gruppe von degenerierten Domänen, die anstelle ihrer enzymatischen Funktion (PDE-Aktivität) eine regulatorische übernommen haben (Hengge, 2009).

5.1.3 MASE1-umfassende TM-Region mit aktivierenden und inhibierenden Rollen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die N-terminale Transmembranregion, die von einer sensorischen MASE1-Domäne geprägt ist, mit verschiedenen Funktionen assoziiert werden. Dabei kamen sowohl aktivierende als auch inhibierende Einflüsse auf die DgcE-vermittelte Matrixproduktion zutage sowie eine bedeutende Rolle bei proteolytischen Prozessen.

Die Gesamtheit aller zehn Transmembrandomänen (TM) ist notwendig für die Biofilmbildung. Dabei sind die DgcE-eigenen Domänen von entscheidender Bedeutung und können nicht durch TM1+2^{LacY}-vermittelte Membranständigkeit ersetzt werden (vgl. *dgcE*, *dgcE*^{ΔTM}, TM1+2^{LacY}::*dgcE*^{ΔTM} in Abb. 7A & 12). Grund dafür ist ein DgcE-aktivierendes Signal seitens YjdA und YjcZ, welches über die TM^{DgcE}-Region durch direkte Proteininteraktionen integriert wird (Abb. 21, vgl. 5.3) und die sensorische Bedeutung der MASE1-Domäne untermauert.

Erste Experimente, in denen die als MASE1 annotierte Domäne (TM 1-8) (Nikolskaya et al., 2003) getrennt von den TMs 9+10 untersucht wurde (vgl. 4.1.4), deuten auf eine differenzierte Aktivitätskontrolle der DgcE-vermittelten Matrixproduktion durch die TM-Region hin. Bei vergleichsweise geringen zellulären Proteinmengen rief plasmidkodiertes DgcE^{ΔMASE1}::6His in einer chromosomalen *dgcE*-Deletionsmutante einen Δ*pdeR*-ähnlichen Phänotypen hervor, der unabhängig von YjdA und YjcZ zustande kam und nicht mit erhöhten c-di-GMP-Mengen korrelierte (Abb. 29, 30 & 31). Dieser Phänotyp weist auf eine c-di-GMP-unabhängige ständige Aktivierung der *csgD*- und somit Matrixproduktion hin. Demnach käme der MASE1-Domäne eine hemmende Rolle zu, indem sie der Aktivierung der DgcM/MlrA-vermittelten *csgD*-Expression entgegen wirkt. Die TMs 9+10 von DgcE hingegen sind offenbar an der aktiven DgcE-Form beteiligt, die die Matrixsynthese einleitet, und die nicht durch andere Transmembrandomänen ersetzt werden können (vgl. *dgcE*^{ΔMASE1}::6His & TM1+2^{LacY}::*dgcE*^{ΔTM}::6His in Abb. 29).

Die Tatsache, dass der DgcE^{ΔMASE1}-vermittelte hyperaktive Phänotyp (Δ*pdeR*-ähnlich) unabhängig von YjdA und YjcZ generiert wurde, rückt die MASE1-Domäne als potentiell Angriffsziel der Aktivatoren YjdA und YjcZ in den Vordergrund, die der inhibitorischen Wirkung der MASE1-Domäne entgegenwirken könnten (vgl. 5.3). In zukünftigen Studien sollte daher der genaue Interaktionsmechanismus zwischen der TM-Domäne von DgcE und

YjdA vertieft untersucht werden. So könnte YjdA direkt mit der MASE1-Domäne interagieren, oder aber mit den TMs 9+10. Außerdem könnte eine sukzessive Deletion einzelner Transmembrandomänen weiterhin Aufschluss darüber geben, welche Transmembrandomänen genau für aktives DgcE vonnöten sind.

Im Laufe dieser Arbeit haben Hydrophobitätsanalysen mehrerer MASE1-assoziiierter Proteine aus verschiedenen Bakterienkladen gezeigt, dass der hydrophobe N-Terminus in der Regel etwa 300 AS und eher zehn anstelle von acht Transmembrandomänen umfasst (R. Hengge, unveröffentlicht). Demnach stellen die TMs 9+10 in DgcE vermutlich keine Besonderheit dar, sondern könnten Teil der MASE1-Domäne sein. Dies schließt die Integration von sowohl aktivierenden als auch inhibierenden Signalen jedoch nicht aus und steht somit nicht im Widerspruch zu den hier gezeigten Daten.

Eine weitere Funktion der TM-Region von DgcE ist an proteolytische Ereignisse geknüpft. Das Vorhandensein der DgcE-eigenen TM-Domänen ist auch hierbei entscheidend und kann durch die ersten beiden Transmembrandomänen von LacY (TM1+2^{LacY}) nur begrenzt kompensiert werden (Abb. 10 & 13). Lösliche DgcE-Varianten waren äußerst stabil (Abb. 10 & 13), sodass die N-terminale TM-Region von DgcE offensichtlich als Angriffspunkt der Proteolyse dient. Dabei hat sie keine autoproteolytischen Eigenschaften inne, da eine Überexpression von *dgcE* in der Stabilisierung von DgcE-Protein resultierte (Abb. 14). Sehr wahrscheinlich ist die Beteiligung einer oder mehrerer membranassoziierter Proteasen.

Da die TM-Domänen für die Aktivität von DgcE erforderlich sind (siehe oben) und die Proteolyse vom N- zum C-Terminus erfolgt, ist die massive Degradation sehr wahrscheinlich ein Mechanismus zur Inaktivierung von DgcE. Bemerkenswerterweise wurde für die *E. coli* PDE PdeA, die ebenfalls eine N-terminale MASE1-Domäne aufweist, ein ähnliches Proteolysemuster in sämtlichen Wachstumsphasen beobachtet (Sarenko et al., 2017). Auch die unter anaeroben Bedingungen exprimierte PDE YfgF (mit MASE1-Domäne) aus *S. enterica* zeigte bei Immunoblotexperimenten eine Proteinbande, die kleiner war als das erwartete Fragment (Lacey et al., 2013). Eine generelle Funktion der MASE1-Domäne könnte folglich in dem proteolytischen Umsatz von membranständigen Signalproteinen bestehen.

Diese Arbeit zeigt, dass die N-terminale TM-Region von DgcE einen Knotenpunkt der Signalintegration darstellt und dabei aktivierende und inhibierende Funktionen vereint. Die Interaktion mit der GTPase YjdA bewirkt insgesamt eine Aktivierung der Matrixsynthese. Als Ausgangspunkt einer massiven Proteolyse trägt sie aber auch zur Inaktivierung von DgcE bei. Diese beiden Funktionen scheinen nicht gekoppelt zu sein, weil sich Deletionen von *yjdA* und *yjcZ* nicht auf die Proteolyse von DgcE auswirkten (Abb. 18B). In den folgenden Kapiteln wird die Rolle der TM-Region im Kontext der DgcE-Proteolyse (5.2), YjdA/YjcZ-abhängigen DgcE-Aktivität (5.3) und lokalen Signaltransduktion (5.4) weiterhin diskutiert.

5.2 Proteolyse von DgcE

DgcE unterliegt einer massiven Degradation in sämtlichen Wachstumsphasen (Abb. 9B), wobei die Proteolyse vom N- zum C-Terminus erfolgt und vom Vorhandensein der N-terminalen TM-Region abhängt (vgl. 5.1.3). Dabei scheint die Proteolyse äußerst effizient zu verlaufen, da für chromosomal kodiertes DgcE::3xFLAG in Immunoblotanalysen kein Volllängenprotein auszumachen war (Abb. 10). Anhand dieser Beobachtungen lässt sich begründen, weshalb sich N-terminal markiertes DgcE stets als ungeeignet für Westernblot- und Interaktionsanalysen erwies. Es ist äußerst wahrscheinlich, dass sowohl ein N-terminaler 3xFLAG-tag als auch N-terminale T18- bzw. T25-Fragmente ständig durch proteolytische Prozesse abgespalten werden, was weder die Immunoblotdetektion noch T18/T25-abhängige Interaktionsanalysen erlaubte.

Lösliche DgcE-Varianten waren sehr stabil und konnten durch TM1+2^{LacY}-vermittelte Membranständigkeit der Proteolyse zugänglich gemacht werden. Diese fiel aber verglichen mit dem Volllängenprotein (DgcE::3xFLAG) deutlich geringer aus (Abb. 10 & 13). Die Integration in die Membran ist somit notwendig für die proteolytische Umsetzung von DgcE, wobei der DgcE-eigenen TM-Region eine spezifische Rolle zukommt, die durch andere Transmembrandomänen nicht vollständig übernommen werden kann.

Die Gesamtheit dieser Befunde weist auf mindestens eine membranständige Protease hin, die DgcE prozessiv abbaut. Die Identität solch einer Protease sowie deren DgcE-Erkennungsmechanismus konnte in dieser Arbeit trotz umfangreicher Analysen anhand von Protease-Deletionsmutanten nicht geklärt werden. Die Tatsache, dass auch eine TM1+2^{LacY}::DgcE^{ΔTM}-Variante eine proteolytische Umsetzung anzeigte, deutet allerdings darauf hin, dass DgcE nicht über eine bestimmte Signalsequenz der Proteolyse zugeführt wird. Die durch diverse Glycine, Alanine, Serine und Proline geprägte MASE1-Domäne lässt auf eine flexible Struktur schließen (Nikolskaya et al., 2003) und deutet eher auf die Erkennung von zeitweise instabilen oder ungefalteten Strukturen hin, die von Proteasen der Proteinqualitätskontrolle erkannt werden. Selbiges gilt für die Proteolyse von TM1+2^{LacY}::DgcE^{ΔTM}-Varianten, da die ersten beiden Transmembrandomänen von LacY vermutlich instabiler sind als die gesamte TM-Domäne von LacY.

Ausgehend von dieser Hypothese sind die membranständigen Proteasen FtsH (ATP-abhängige AAA+ Protease) sowie HtpX nach wie vor wahrscheinliche Kandidaten für die DgcE-Proteolyse. Die Möglichkeit einer FtsH-Beteiligung wird durch die Dissertationsarbeit von Dr. Verena Suchanek untermauert. Mithilfe von Pulldown-Experimenten wurde dort eine Interaktion von DgcE mit FtsH sowie seinen Regulatorkomponenten HflK und HflC beschrieben (Suchanek, 2016). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit erzeugten Einzeldelationen von *ftsH* (+ Supressormutation *sfhC21*) und *htpX* zwar kein verändertes DgcE-Degradationsmuster (Abb. 15 & 16A), aber aus früheren Studien ist bekannt, dass

beide Proteasen am proteolytischen Umsatz von Membranproteinen mitwirken und sich teilweise komplementieren können. Beispielsweise wurde die transmembrane Translokase-Untereinheit SecY als FtsH-Substrat beschrieben, welches in einer *ftsH*-Mutante auch durch HtpX prozessiert werden kann (Sakoh et al., 2005). Es ist demnach möglich, dass die Deletion einer dieser Proteasen nicht ausreicht für die Stabilisierung des DgcE-Proteins.

Da die gleichzeitige Deletion von *ftsH* und *htpX* in einem starken Wachstumsdefizit resultiert (Shimohata et al., 2002), ist die Analyse solch einer Doppelmutante in Hinblick auf die DgcE-Proteolyse jedoch nicht möglich. In zukünftigen Studien bezüglich einer potentiellen FtsH-beteiligten DgcE-Proteolyse sollte daher auf die *in vitro* FtsH^{trap}-Methode zurückgegriffen werden. Hierbei wird eine FtsH-Variante verwendet, die aufgrund ihrer ATPase-Aktivität zur Substratbindung fähig ist, diese aber nicht mehr proteolytisch umsetzen kann. Nach der Aufreinigung und Massenspektrometrie können so Rückschlüsse auf die Substratproteine gezogen werden (Westphal et al., 2012).

Neben der oben beschriebenen massiven DgcE-Degradation, die in einer Inaktivierung resultiert, wurde auch eine verstärkte Prozessierung der EAL_{deg}-Domäne in der Stationärphase beobachtet, die eine Aktivierung der DgcE-vermittelten Matrixsynthese nach sich ziehen könnte (vgl. 5.1.2). Diese Beobachtung hing lediglich von Membranständigkeit ab und erfolgte unabhängig von der N-terminalen TM-Domäne. Es ist somit nicht auszuschließen, dass noch weitere Proteasen in die DgcE-Proteolyse eingreifen.

Bemerkenswert ist, dass geringe zelluläre Mengen an DgcE^{ΔMASE1::6His}-Protein für eine stark aktivierte Biofilmbildung ausreichen (vgl. 5.1.3). Diese Beobachtung passt zu kaum detektiertem DgcE-Volllängenprotein bzw. Di- und Oligomeren, die für eine aktive Form von DgcE vonnöten sind (Abb. 10). Demnach muss die DgcE-vermittelte Matrixsynthese äußerst effizient ablaufen. Ein Grund für die ständige Proteolyse von DgcE liegt somit wahrscheinlich in der immensen Bedeutung, die DgcE für die Biofilminitiation hat. Vorwiegend in der Stationärphase unterliegt DgcE einer ständigen *de novo* Expression, um bei Bedarf sofortige Matrixexpression einzuleiten. Da die Matrixsynthese jedoch nur unter bestimmten Bedingungen notwendig wird, unterliegt DgcE einer steten Aktivitätskontrolle, die seine Proteolyse einschließt. Somit könnte sichergestellt werden, dass zelluläre Ressourcen nicht für unnötige Matrixsynthese verbraucht werden.

Die Instabilität von DgcE machte eine Aufreinigung und *in vitro* Analysen in dieser Arbeit nicht möglich, sodass vorwiegend eine genetische Herangehensweise erforderlich war. Die Identifizierung der Protease bzw. Proteasen, die für den Abbau von DgcE verantwortlich sind, wird daher für weitere Studien von großem Nutzen sein, da die Deletion einer solchen Protease die Aufreinigung von DgcE erleichtern wird. So könnten verschiedene DgcE-Varianten schließlich unter bestimmten Bedingungen leichter auf Enzymfunktionen, Ligandenbindung und Interaktionen untersucht werden.

5.3 DgcE-Aktivitätskontrolle durch ein GTPase-System

Essentiell für die DgcE-abhängige Regulation des PdeR/DgcM/MlrA-Moduls und letztlich die Initiierung der *csdD*-Expression ist der aktivierende Einfluss von YjdA und YjcZ. Da sich Deletionsmutanten von *dgcE*, *yjdA* und *yjcZ* stets gleich verhielten (Abb. 17) und das Fehlen von *dgcE* durch eine Überproduktion von YjdA-YjcZ nicht kompensiert werden konnte (Abb. 25A), wurde deutlich, dass die drei Proteine im gleichen Signalweg wirken, wobei DgcE durch YjdA und YjcZ aktiviert wird. Über direkte Protein-Interaktionen sind DgcE, YjdA und YjcZ zu einer Komplexbildung befähigt, wobei YjdA als Bindeglied dient und auf die TM-Region von DgcE einwirkt (Abb. 19 & 21). Es zeigte sich, dass die YjdA-Oligomerisierung, die Interaktion zwischen YjdA und DgcE sowie die Matrixsynthese von der GTPase-Aktivität des Dynamin-ähnlichen Proteins YjdA abhängen, wobei eine ständige GTP-Bindung ohne Hydrolyse (*yjdA*^{T103D}) inhibierend wirkt (Abb. 23 & 24). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion zwischen YjdA und DgcE ein aktivierendes Signal für die Matrixsynthese darstellt, welches durch zelluläres GTP als YjdA-Substrat reguliert wird.

Wie genau die interaktionsabhängige DgcE-Aktivierung durch YjdA/YjcZ erfolgt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Tatsache, dass Deletionen von *yjdA* und *yjcZ* in einer gleichermaßen reduzierten zellulären c-di-GMP-Konzentration resultierten wie in einer *dgcE*-Deletionsmutante (Abb. 17D), lässt jedoch auf die Aktivierung der DGC-Aktivität von DgcE durch YjdA/YjcZ schließen.

YjdA wurde als oligomerisierendes Protein beschrieben (Ozaki et al., 2013) und zeigte auch in dieser Arbeit eine äußerst starke Interaktion mit sich selbst (Abb. 19). Für Dynamine und bakterielle Dynamin-ähnliche Proteine ist bekannt, dass diese als Oligomere an die Membran binden und über GTPase-abhängige Konformationsänderungen Membranabschnürungen vermitteln können (Bramkamp, 2012; Daumke and Praefcke, 2016). YjdA ist in dieser Hinsicht ein untypisches Dynamin-ähnliches Protein, weil es löslich ist und keine membranbindenden Eigenschaften aufweist, da das hydrophobe *paddle*-Motiv fehlt (Ozaki et al., 2013). Seine Aufgabe könnte stattdessen darin bestehen durch Oligomerisierung und Bindung an die TM-Domäne von DgcE mehrere DgcE-Moleküle in unmittelbare Nähe zueinander zu bringen, sodass die PAS-vermittelte Di- bzw. Oligomerisierung von DgcE ermöglicht und GGDEF-abhängige c-di-GMP-Synthese eingeleitet wird (vgl. 5.1.1).

Die reduzierte Biofilmbildung in chromosomalen (*dgcE*^{ΔEAL}Δ*yjdA*/Δ*yjcZ*)-Mutanten verglichen mit einer *dgcE*^{ΔEAL}-Mutante (Abb. 18A) könnte somit auf eine fehlende aktive Di- bzw. Oligomerform von DgcE^{ΔEAL} zurückführbar sein. Plasmidkodiertes DgcE^{ΔEAL}::6His zeigte neben einer stark erhöhten DGC-Aktivität auch verstärkte Oligomerisierung an (Abb. 13 & 29B), was durch Deletionen von *yjdA*-*yjcZ* verhindert werden könnte.

Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass eine DgcE-Überexpression auch in einer $\Delta yjdA$ - $yjcZ$ -Mutante zu drastisch erhöhten c-di-GMP-Konzentrationen führte (Abb. 25C). Unter solchen Bedingungen fand die Di- bzw. Oligomerisierung von DgcE also unabhängig von YjdA und YjcZ statt, sodass bei einer hohen DgcE-Proteindichte (wovon hierbei auszugehen ist) keine Helferproteine notwendig sind. Hierin zeigt sich, dass die Stöchiometrie aller beteiligten Komponenten für eine feinregulierte Matrixsynthese von großer Bedeutung ist.

Um eine eindeutige Beteiligung von YjdA und YjcZ an der DgcE-Dimerisierung bzw. -Oligomerisierung festzustellen, sollte in künftigen Interaktionsstudien die DgcE-Dimerisierung in einer $yjdA$ - $yjcZ$ -Deletionsmutante getestet werden.

In dem YjdA/YjcZ-bedingten DgcE-aktivierenden Prozess spiegelt sich erneut die Bedeutung der MASE1-umfassenden TM-Domäne von DgcE wider, die als Zieldomäne der YjdA-Interaktion ermittelt wurde (Abb. 21). Wie in 5.1.3 diskutiert wird, scheint die MASE1-Domäne (TMs 1-8) eine inhibitorische Rolle bei der DgcE-Aktivität auszuüben, die durch YjdA und YjcZ aufgehoben werden könnte. Da plasmidkodiertes DgcE ^{Δ MASE1::6His} jedoch nicht als Oligomer akkumulierte (Abb. 30), ist es unwahrscheinlich, dass die MASE1-Domäne eine direkte Di- bzw. Oligomerisierung von DgcE verhindert.

Denkbar ist aber z. B. eine MASE1-generierte DgcE-Konformation, die DgcE sterisch in einen inaktiven Zustand versetzt. Eine YjdA/YjcZ-vermittelte Oligomerisierung und Konformationsänderung durch Interaktionen mit der TM-Domäne könnte schließlich eine aktive Form begünstigen, wodurch die DGC-Aktivität ermöglicht und die Matrixproduktion initiiert werden kann. Gestützt wird diese Annahme durch die Beschaffenheit der MASE1-Domäne. Einerseits ist sie geprägt von einer Vielzahl an Glycinen, Alaninen und Serinen, die eine flexible Struktur vermuten lassen. Andererseits finden sich intrahelikale Proline, die helikale Knicke verursachen können und typisch sind für membranständige Enzyme, die zwischen verschiedenen Konformationen wechseln (Nikolskaya et al., 2003; Ubarretxena-Belandia and Engelman, 2001).

Zukünftige Interaktionsstudien zwischen YjdA und weiteren MASE1-umfassenden Proteinen könnten klären, ob eine generelle Funktion von MASE1-Domänen in der YjdA-vermittelten Signalintegration besteht.

Anhand einer $yjdA^{T103D}$ -Mutante, die zwar zur GTP-Bindung, nicht aber zur GTP-Hydrolyse befähigt ist, wurde deutlich, dass die Dimerisierung von YjdA sowie die Interaktion zwischen YjdA und DgcE von der GTPase-Aktivität von YjdA abhängt, wodurch schließlich die Aktivierung von DgcE begünstigt wird. Dass die GTPase-Aktivität von YjdA für die Interaktion zwischen DgcE und YjdA und somit für die Matrixsynthese bedeutend ist, wird durch Daten von Dr. Verena Suchanek gestützt. Zeitgleich zum Entstehen dieser Arbeit zeigte sie, dass

DgcE, YjdA und YjcZ gemeinsam die Motilität und Bildung von submersen Biofilmen kontrollieren, wobei die GTPase-Aktivität von YjdA entscheidend war (Suchanek, 2016).

Die verminderte Dimerisierung von YjdA^{T103D} sowie die fehlende Interaktion zwischen YjdA^{T103D} und DgcE (Abb. 24) lässt zweierlei Hypothesen zu: (i) Entweder agiert GTP als ein direkter Inhibitor dieser Proteininteraktionen oder (ii) die Hydrolyse von GTP ist notwendig für eine Konformationsänderung von YjdA, die seine Oligomerisierung und Interaktion mit DgcE erlaubt.

Dass GTP ein Signal für zelluläre Entwicklungsprozesse darstellen kann, ist bekannt. So wird in *B. subtilis* beispielsweise die Repression verschiedener Sporulationsgene durch das GTP-bindende Protein CodY bewirkt und bei sinkenden GTP-Konzentrationen aufgehoben, sodass die Sporulation erst bei ungünstiger Nährstoffverfügbarkeit eingeleitet wird (Ratnayake-Lecamwasam et al., 2001). Auch für eine regulatorische Beteiligung von GTP in der c-di-GMP-vermittelten Signaltransduktion gibt es bereits Hinweise. Christen *et al.* haben gezeigt, dass die PDE CC3396 aus *C. crescentus* über seine enzymatisch inaktive GGDEF-Domäne GTP binden kann und dadurch die EAL-vermittelte PDE-Aktivität erhöht. (Christen et al., 2005).

DgcE hat in der stationären Wachstumsphase einen entscheidenden Einfluss auf die physiologische Umstellung von der Flagellensynthese und Motilität hin zur Matrixsynthese, sodass zelluläres GTP als Indikator der Nährstoffverfügbarkeit ein plausibles Kontrollsignal darstellt. In wachsenden Zellen liegt die zelluläre GTP-Konzentration bei etwa 1 mM. Ab dem Eintritt in die Stationärphase fällt diese um ein Vielfaches ab und steigt anschließend wieder leicht an (Bochner and Ames, 1982; Buckstein et al., 2008). Die zunehmende DgcE-Aktivität ab dem Eintritt in die Stationärphase geht folglich mit einem drastischen Abfall zellulärer GTP-Mengen einher.

Im Gegensatz zu den meisten GTPasen, weisen Dynamine in der Regel eine geringe Nukleotidaffinität auf (Daumke and Praefcke, 2016; Song et al., 2004). Es ist daher denkbar, dass YjdA in wachsenden Zellen aufgrund hoher zellulärer GTP-Konzentrationen vermehrt in der GTP-gebundenen Form vorliegt, wodurch seine Oligomerisierung sowie Interaktion mit DgcE gestört wird und keine Aktivierung von DgcE erfolgt. Bei sinkenden GTP-Mengen und gleichzeitig ansteigenden YjdA-Proteinmengen beim Übergang in die Stationärphase (Abb. 20) liegt YjdA hingegen vermutlich vermehrt in Nukleotid-freier Form vor, was die Oligomerisierung und Interaktion mit DgcE ermöglichen und somit die Matrixsynthese aktivieren könnte (demnach würde GTP als Inhibitor agieren). Die häufig beobachtete geringe Nukleotidaffinität von Dynaminen (siehe oben) wäre hierbei essentiell dafür, dass bei geringen zellulären GTP-Mengen die Bindung von GTP (und GDP) an YjdA verringert wird, wohingegen die GTP-Affinität von DgcE hoch genug sein muss, um GTP über seine GGDEF-Domäne zu binden und c-di-GMP zu synthetisieren.

In künftigen Studien könnten biochemische Experimente Aufschluss über die GTPase-Aktivität von YjdA unter verschiedenen Bedingungen liefern. Auch kann die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) sowie der maximalen enzymatischen Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) Rückschlüsse auf die GTP-Bindung und -Hydrolyse in wachsenden und stationären Zellen liefern. Zusätzlich sollte sowohl die Oligomerisierung von YjdA als auch die Interaktion zwischen DgcE und YjdA entlang der Wachstumskurve verfolgt werden. Ausgehend von der oben diskutierten Hypothese müssten beide Interaktionsereignisse in wachsenden Zellen deutlich geringer ausfallen (schwächere Rotfärbung im BTH-Experiment) als in stationären Zellen (stärkere Rotfärbung im BTH-Experiment).

Die Funktion von YjcZ, das genauso entscheidend für die DgcE-Aktivierung ist wie YjdA (Abb. 17), bleibt ungeklärt. Die meisten Dynamamin-ähnlichen Proteine sind als Paare in Operonen organisiert und bilden heterotypische Komplexe, was essentiell für deren Funktion ist (Bramkamp, 2012; Liu et al., 2018). YjcZ ist zwar im Gegensatz zu YjdA kein Vertreter der Dynamamin-ähnlichen Proteine, dennoch bilden *yjdA* und *yjcZ* eine Transkriptionseinheit, wobei sogar eine translationale Kopplung besteht (Stop-Codon von *yjdA* ist Teil des Start-Codons von *yjcZ*). Dies zeigt weiterhin die Bedeutung beider Proteine. YjcZ verfügt über keine GTPase-Domäne und interagiert nicht mit DgcE. Durch eine starke Interaktion mit YjdA (Abb. 19) könnte YjcZ jedoch für die Funktionalität von YjdA ausschlaggebend sein, indem es z. B. als GTP-Austauschfaktor oder anderweitig agiert. Um dies zu klären, bedarf es allerdings weiterer Analysen.

Die Gesamtheit der Daten lässt darauf schließen, dass DgcE durch ein GTPase-System aktiviert wird, wodurch schließlich *csgD*-Expression eingeleitet und Biofilmbildung gefördert wird. Es wurde deutlich, dass YjdA dabei durch eine GTPase-abhängige Interaktion mit der TM-Region von DgcE diesen Prozess aktiviert.

Neben dieser Arbeit haben zwei weitere Forschungsgruppen eine eindeutige Beteiligung von YjdA an bakterieller Motilität und Biofilmbildung feststellen können (Girgis et al., 2007; Suchanek, 2016). Eine Studie von Ozaki et al. (2013) beschreibt YjdA (CrnC) hingegen als ein Protein, das an der Co-Lokalisation von entstehenden DNA-Strängen während der DNA-Replikation und somit an der chromosomalen Teilung beteiligt ist (Ozaki et al., 2013). Ein Zusammenhang zu diesem Befund konnte im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht festgestellt werden. Auch wurden keine Auffälligkeiten bezüglich des Wachstums von *yjdA*-Deletionsmutanten beobachtet, was im Gegensatz zu einer Beteiligung von YjdA an zellulären Teilungsprozessen steht. Es ist dennoch denkbar, dass YjdA verschiedene Funktionen ausübt, die abhängig von bestehenden Umweltbedingungen wechseln. Solch multifunktionale Proteine sind bereits beschrieben und werden als *moonlighting proteins* bezeichnet, wobei einige an völlig unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt sind (Huberts and van der Klei, 2010).

5.4 Lokale Signaltransduktion der DgcE-vermittelten Regulation des PdeR/DgcM/MlrA-Moduls

Wie bereits in 5.1.1 erläutert wurde, hängt der regulatorische Effekt von DgcE auf das PdeR/DgcM/MlrA-Modul von DgcE-generiertem c-di-GMP ab. Im Laufe dieser Arbeit wurde jedoch auch deutlich, dass neben der DGC-Aktivität von DgcE eine auf lokaler Signaltransduktion basierende Regulation des PdeR/DgcM/MlrA-Moduls und der *csgD*-Expression durch DgcE erfolgen muss.

Die Überexpression von DgcE und damit einhergehende stark erhöhte zelluläre c-di-GMP-Mengen führten nicht zwangsläufig zu vermehrter *csgB::lacZ*-, also Curli-Expression, welche der direkten Kontrolle von CsgD unterliegt (Abb. 25 & 26). Dies wurde auch anhand einer Makrokolonie bei pCAB18-exprimiertem DgcE^{ΔEAL}::6His sichtbar, die trotz einer hohen zellulären c-di-GMP-Konzentration nicht auf gleichermaßen erhöhte Expression von Curli-Fimbrien und pEtN-Cellulose schließen ließ, sondern v. a. von stark vermehrter pEtN-Cellulose geprägt war – ein Phänotyp, der auf die verstärkte pEtN-Cellulosesynthese aufgrund einer hohen zellulären c-di-GMP-Konzentration zurückzuführen ist (Abb. 29). Hingegen resultierte plasmidexprimiertes DgcE^{ΔMASE1}::6His in einem $\Delta pdeR$ -Phänotypen (also Überproduktion von Curli und pEtN-Cellulose), der nicht mit erhöhten zellulären c-di-GMP-Konzentrationen einher ging (Abb. 29).

Die Hypothese einer lokalen Signaltransduktion seitens DgcE wurde auch von Sarenko *et al.* (2017) postuliert, die zeigten, dass DgcE trotz seiner entscheidenden Rolle innerhalb der Biofilmmatrix-Kontrollkaskade einen unerwartet geringen Einfluss auf die zelluläre c-di-GMP-Konzentration ausübt. DgcE wurde als Teil eines Protein-Interaktionsnetzwerkes beschrieben, wobei eine starke Interaktion zwischen DgcE und PdeR festgestellt wurde (Sarenko *et al.*, 2017). Eine solche Interaktion konnte in dieser Promotionsarbeit nicht eindeutig bestätigt werden (Abb. 27). Da Sarenko *et al.* (2017) aber von der Bacterio-Match[®] II-Methode Gebrauch machten und daher lediglich lösliches DgcE in ihre Studien einbezogen (vgl. 5.1.1), schließen sich die zunächst konträr erscheinenden Befunde nicht aus. Die größere Proteinstabilität von löslichen DgcE-Varianten im Vergleich zu membrangebundenen DgcE-Varianten (Abb. 10) trägt nämlich vermutlich dazu bei, dass lösliches DgcE für Interaktionsexperimente mit PdeR besser geeignet ist als das in dieser Promotionsarbeit verwendete Vollängen-DgcE.

Denkbar wäre zudem Folgendes: Wie in 5.3 diskutiert wird, hat die MASE1-Domäne (TMs 1-8) vermutlich einen negativen Einfluss auf die DgcE-Aktivität, der durch YjdA/YjcZ aufgehoben werden könnte. Da YjdA und YjcZ die DGC-Aktivität von DgcE aktivieren, wird vorgeschlagen, dass die MASE1-Domäne einen sterischen Zustand bewirken könnte, der eine c-di-GMP-produzierende Proteinkonformation verhindert (ohne dabei die DgcE-Oligomerisierung zu beeinflussen), wohingegen YjdA und YjcZ als Di- bzw.

Oligomerisierungshelfer dienen könnten (vgl. 5.3). Durch die Konformation der MASE1-Domäne könnte zusätzlich eine Interaktion zwischen PdeR und löslichen Teilen von DgcE verhindert werden, sodass das Volllängen-DgcE kaum Interaktionen mit PdeR anzeigt (diese Arbeit), wohingegen das Fehlen der TM-Domänen eine Interaktion vermehrt zulässt (Sarenko et al., 2017).

Neben Hinweisen darauf, dass DgcE direkt mit PdeR interagiert (siehe oben), konnten im Rahmen dieser Arbeit zudem Interaktionen zwischen PdeR und YjdA beobachtet werden (Abb. 27B), sodass eine Stabilisierung der PdeR/DgcE-Interaktion durch YjdA nicht ausgeschlossen werden kann. PdeR wird demnach höchstwahrscheinlich über direkte Protein-Protein-Interaktionen an die Zellmembran in unmittelbare Nähe von DgcE rekrutiert, wodurch PdeR für DgcE-synthetisiertes c-di-GMP zugänglich gemacht wird und DgcM und MlrA die *csgD*-Expression am *csgD*-Promoter einleiten können.

Die oben erläuterten Hypothesen stünden im Einklang mit dem $\Delta pdeR$ -Phänotypen, welcher durch die Expression von *dgcE* ^{$\Delta MASE1::6His$} zustande kam und sowohl unabhängig von c-di-GMP als auch YjdA/YjcZ war (Abb. 29 & 31). Unter solchen Bedingungen wird PdeR ständig von seinem inhibierenden Effekt auf DgcM/MlrA abgehalten, was vermutlich auf direkten Protein-Interaktionen zwischen PdeR und DgcE/YjdA beruht. Da der inhibierende Effekt der MASE1-Domäne hier komplett fehlt, wäre eine Aktivierung seitens YjdA/YjcZ dann hinfällig. Zukünftig sollte durch weitere Interaktionsstudien geklärt werden, wie DgcE, YjdA und PdeR miteinander in Kontakt treten, wobei auch *in vitro* Experimente zwischen PdeR und stabilem DgcE ^{ΔTM} zum Einsatz kommen sollten.

Unklar bleibt, weshalb neben einer interaktionsbasierten PdeR-Rekrutierung an die Membran zusätzlich die DGC-Aktivität von DgcE notwendig ist. Möglicherweise ist eine Interaktion zwischen PdeR und DgcE/YjdA unter physiologischen Bedingungen relativ schwach und wird durch die PDE-Aktivität von PdeR stabilisiert. In einer *dgcE*^{*GGAAF*}-Mutante, die kein c-di-GMP produziert, das von PdeR abgebaut werden kann, wäre die dauerhafte Rekrutierung von PdeR dann nicht möglich, sodass die Matrixsynthese nicht aktiviert wird. Diese Vermutungen sind aber rein spekulativ und müssen experimentell untersucht werden.

Auch gab es erste Hinweise darauf, dass die chromosomale Kopie von *dgcE* eine besondere Rolle für die Matrixsynthese spielen muss, die durch plasmidkodiertes *dgcE* nicht vollständig übernommen werden kann. Eine Überexpression von DgcE resultierte sowohl im Wildtyp als auch in *dgcE*- und *yjdA-yjcZ*-Deletionsmutanten in dramatisch erhöhten c-di-GMP-Konzentrationen. Lediglich im Wildtypen führte dies jedoch zu einer Überexpression von Curli und pEtN-Cellulose, wohingegen eine Überexpression in *dgcE*- und *yjdA-yjcZ*-Deletionsmutanten v. a. eine verstärkte Expression von pEtN-Cellulose anzeigten (Abb. 25 & 26). Chromosomales *dgcE* könnte folglich einer spezifischen Expressionskontrolle unterliegen, deren Natur bislang völlig unklar ist.

5.5 Modell der DgcE-vermittelten Matrixexpression

Die Aktivitätskontrolle von DgcE und die damit verbundene Regulation der Biofilmmatrixsynthese über das PdeR/DgcM/MlrA-Modul stellte sich als äußerst umfangreich und komplex heraus. Im Folgenden sollen daher die in dieser Arbeit erhobenen und diskutierten Daten in einem Modell zusammengefasst und in einen physiologisch relevanten Kontext gestellt werden (Abb. 38).

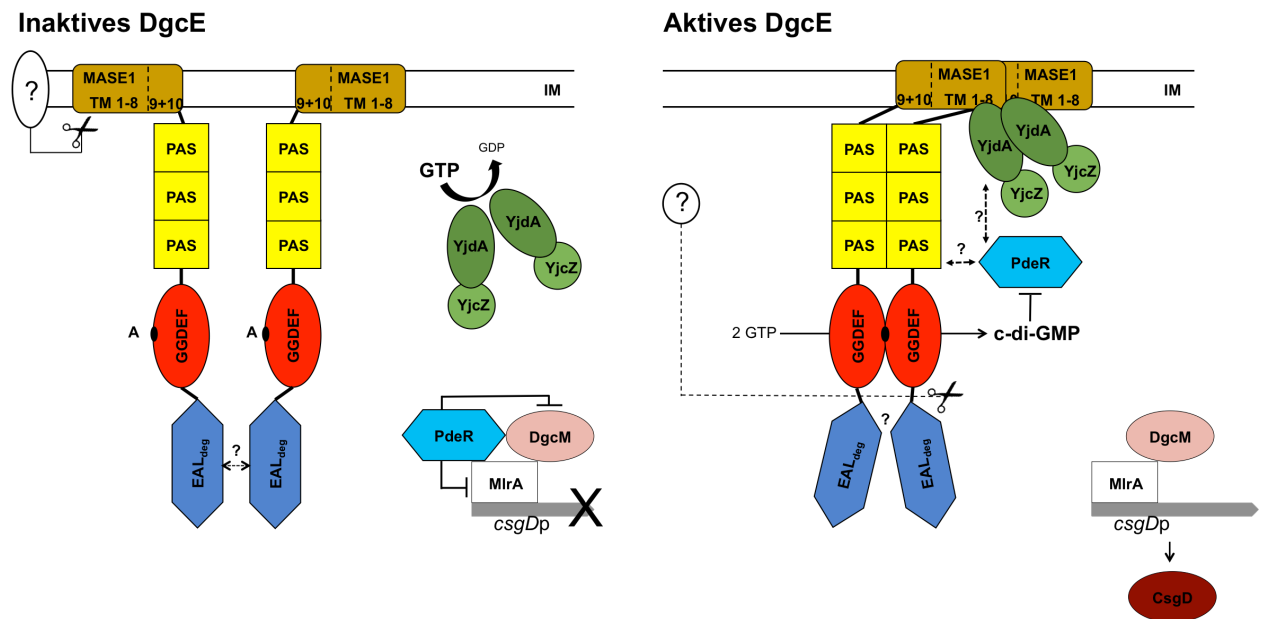


Abb. 38: Modell der Aktivitätskontrolle von DgcE. DgcE unterliegt einer ständigen Regulation, wodurch die Expression des Biofilmregulators CsgD streng kontrolliert wird. Hier ist vereinfacht die Dimerisierung von DgcE dargestellt. Oligomerkomplexe sind aber wahrscheinlich ebenfalls an aktivem DgcE beteiligt. **Inaktives DgcE:** In wachsenden Zellen liegt die Dynamin-ähnliche GTPase YjdA aufgrund einer hohen zellulären GTP-Konzentration vorwiegend in GTP-bindender Form vor, die nur eine geringe YjdA-Oligomerisierung zulässt und keine Interaktion mit DgcE erlaubt. Eine Di- bzw. Oligomerisierung von DgcE wird durch die degenerierte EAL-Domäne (EAL_{deg}) verhindert, wobei eine direkte Dimerisierung der EAL_{deg} beteiligt sein könnte (O. Sarenko & R. Hengge, unveröffentlicht). Eine ständige Degradation durch eine oder mehrere membranständige Proteasen vom N- zum C-Terminus führt zusätzlich zur Inaktivierung von DgcE. Es findet letztlich keine Aktivierung der DGC-Aktivität statt und somit keine c-di-GMP-Synthese. Die Trigger-PDE PdeR übt seine primäre Funktion aus, die in der interaktionsbasierten Inhibition von MlrA und DgcM besteht und keine *csgD*-Expression zulässt (Lindenberg et al., 2013). **Aktives DgcE:** Beim Eintritt in die Stationärphase sinkt die zelluläre GTP-Konzentration drastisch ab, sodass YjdA vorwiegend in Nukleotid-freier oder GDP-bindender Form vorliegt. YjdA ist daraufhin zur Oligomerisierung und Interaktion mit der MASE1-umfassenden TM-Region von DgcE fähig, wodurch DgcE in eine aktive Form versetzt wird. Über die PAS₃-Domänen wird eine aktive Di- bzw. Oligomerform von DgcE vermittelt, die vermutlich Schutz vor proteolytischen Angriffen bietet. Der antagonistische Effekt der EAL_{deg}-Domäne hingegen wird aufgehoben (evtl. durch vermehrte spezifische Prozessierung dieser durch eine unbekannte Protease). Die GGDEF-Domänen werden somit in eine Dimer-Konformation gebracht, die die Synthese von c-di-GMP ermöglicht. PdeR baut daraufhin mithilfe seiner sekundären PDE-Funktion DgcE-generiertes c-di-GMP ab und wird vermutlich zusätzlich über direkte Proteininteraktionen mit DgcE und/oder YjdA in unmittelbarer Nähe von DgcE rekrutiert. Der fehlende inhibitorische Effekt von PdeR auf MlrA und DgcM ermöglicht die Expression von *csgD* und schließlich der extrazellulären Matrixkomponenten.

Die Umstellung von flagellarer Genexpression in der postexponentiellen Wachstumsphase auf die Expression extrazellulärer Matrixkomponenten während der Stationärphase unterliegt in *E. coli* K12 einer feinregulierten Kontrollkaskade. Dies ist essentiell für eine optimale Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen. Für diesen Prozess spielt die Diguanylatzyklase DgcE eine entscheidende Rolle, indem sie als Haupt-DGC die DgcM/MlrA-vermittelte *csgD*-Expression aktiviert und dabei diverse molekulare Regulationsmechanismen vereint: (i) Antagonistische intramolekulare Funktionen, (ii) Intermolekulare Proteininteraktionen, (iii) Wahrnehmung eines intrazellulären Signalmoleküls (GTP über YjdA), (iv) Aktivitätsverleihende Oligomerisierung und (v) Inaktivierung durch Proteolyse. Das Zusammenspiel all dieser Mechanismen ermöglicht schließlich eine umfangreiche Aktivitätskontrolle von DgcE, wodurch die Matrixexpression nur dann eingeleitet wird, wenn sie für die Zelle auch tatsächlich von Vorteil ist.

In wachsenden Zellen herrschen Bedingungen, die eine ausreichende Nährstoffversorgung bieten. Die zelluläre GTP-Konzentration ist hoch, sodass die bakterielle Dynamin-ähnliche GTPase YjdA vermutlich vorwiegend in GTP-gebundener Form vorliegt. Dies resultiert in verminderter Oligomerisierung von YjdA und lässt keine Interaktion mit DgcE zu. Die EAL_{deg}-Domäne verhindert (evtl. über EAL_{deg}-Dimerisierung) die PAS₃-vermittelte Di- bzw. Oligomerisierung von DgcE, sodass DgcE in einer enzymatisch inaktiven Konformation verbleibt und keine c-di-GMP-Synthese durch die GGDEF-Domänen erfolgen kann. Zusätzlich unterliegt DgcE einer ständigen massiven Degradation, die von seinem N-Terminus her erfolgt und durch eine oder mehrere bislang unbekannte membranständige Proteasen initiiert wird. Somit verbleibt DgcE insgesamt in einem inaktiven Zustand und die Trigger-PDE PdeR übt seine primäre Funktion aus, welche in der interaktionsabhängigen Inhibition des Transkriptionsfaktors MlrA sowie des Co-Aktivators DgcM besteht. Die fehlende Aktivierung der *csgD*-Expression verhindert die Matrixexpression (vgl. Abb. 38: Inaktives DgcE).

Beim Eintritt in die Stationärphase befinden sich die Zellen in einem nährstofflimitierten Zustand. Die zelluläre GTP-Konzentration nimmt 5- bis 10-fach ab, wodurch YjdA wahrscheinlich vorwiegend in einem Nukleotid-freien (oder GDP-gebundenen) Zustand vorliegt, der einerseits zu einer verstärkten YjdA-Oligomerisierung und andererseits zu einer Interaktion mit der TM-Region von DgcE befähigt ist. DgcE wird so in einen Zustand versetzt, der es den PAS₃-Domänen erlaubt, eine DGC-aktivierende Di- bzw. Oligomerkonformation zu vermitteln, wohingegen der inhibierende Effekt der EAL_{deg}-Domäne aufgehoben wird (evtl. durch eine vermehrte gezielte Prozessierung der EAL_{deg}-Domäne durch eine unbekannte Protease). Die zunehmende Oligomerisierung von DgcE resultiert ferner in einer Stabilisierung, indem sie einen gewissen Schutz vor proteolytischen Angriffen bietet. Die GGDEF-Domänen sind nun fähig zur Synthese von c-di-GMP, welches durch PdeR

abgebaut wird (= sekundäre PdeR-Funktion). Hierbei kommt ein auf lokaler Signaltransduktion beruhender Mechanismus zum Tragen, der wahrscheinlich auch eine direkte Protein-Interaktion zwischen PdeR und DgcE/YjdA einschließt. Der fehlende inhibitorische Effekt von PdeR auf MlrA und DgcM führt zur Expression von *csgD* und schließlich zur Synthese von Curli-Fimbrien und pEtN-Cellulose als extrazelluläre Matrixbestandteile (vgl. Abb 38: Aktives DgcE).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Aktivitätskontrolle von DgcE sowie seine Wirkung auf das PdeR/dgcM/MlrA-Modul zu großen Teilen aufgeklärt werden. Aufgrund der Komplexität der DgcE-beteiligten Signaltransduktion werden künftige Studien noch detailliertere Einblicke liefern können, wofür diese Arbeit eine Grundlage bietet.

5.6 Neue Regulatoren der *E. coli* Biofilmbildung

In Kooperation mit Dr. A. Typas (EMBL, Heidelberg) gelang die Identifizierung neuer Gene, die an der Biofilmbildung von *E. coli* beteiligt sind (*rbsK*, *rbsR*, *ydcl*, *yieP*, *puuR*). Analysen bezüglich der Wirkposition dieser Genprodukte innerhalb des Biofilmmatrix-Kontrollnetzwerks ergaben, dass keines wie DgcE, YjdA und YjcZ über das PdeR/DgcM/MlrA-Modul in die c-di-GMP-vermittelte *csgD*-Expression eingreift (Abb. 32A). Obwohl der genaue Wirkmechanismus von RbsK, RbsR, Ydcl, YieP und PuuR in Hinblick auf die Biofilmbildung nicht abschließend geklärt werden konnte, gelang es, deren Wirkposition näher einzugrenzen.

Von den hier untersuchten Genen bildete *ydcl* eine Ausnahme, da dessen Deletion trotz einer deutlich reduzierten Biofilmstruktur, die v. a. auf verminderte Curli-Expression schließen ließ, keine verringerten Proteinmengen an RpoS (σ^S), MlrA und CsgD sowie keine verminderte *csgB::lacZ*-Expression nach sich zog (Abb. 32). Die biofilmrelevante Funktion von Ydcl muss demnach der Expression von CsgD und den Curli-Strukturgenen *csgB* und *csgA* nachgeschaltet sein.

Da *csgD* und *csgB* in divergenten Operonen liegen (*csgDEFG* und *csgBAC*), welche auch für die Gene kodieren, die für die Sekretion von Curli-Fimbrien notwendig sind, ist es wahrscheinlich, dass sämtliche an der Curli-Expression beteiligten Gene in einer $\Delta ydcl$ -Mutante transkribiert werden. Dies lässt vermuten, dass Ydcl entweder in die Sekretion der Curli-Untereinheiten eingreift, oder aber in die Assemblierung zu vollständigen Curli-Fibrien an der Zelloberfläche. Da Ydcl einen Transkriptionsfaktor darstellt, erscheint eine direkte Einflussnahme auf die Sekretion bzw. Assemblierung eher unwahrscheinlich. Vielmehr ist anzunehmen, dass Ydcl die Expression weiterer Faktoren reguliert, die daraufhin möglicherweise auf diese Prozesse einwirken.

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde Ydcl als ein Transkriptionsregulator der LysR-Familie beschrieben, der in Gram-negativen Bakterien hoch konserviert ist. In *S. Typhimurium* wurde *ydcl* als Teil des *rpoS*-kontrollierten Regulons beschrieben, dessen Induktion in der Biofilmbildung von stationären Zellen resultiert (Jennings et al., 2011). Eine Studie bezüglich der Auswirkungen von *ydcl*-Expression in verschiedenen Gram-negativen Spezies ergab, dass die Expression von chromosomalem *ydcl* in *E. coli* geringer ausfällt als in *S. Typhimurium* und die Überexpression von *ydcl* in *E. coli* zu einer stark verminderten Lebensfähigkeit der Zellen führt (Solomon et al., 2014). Die von Solomon et al. (2014) beobachteten Unterschiede in der Ydcl-Toleranz lassen vermuten, dass Ydcl in verschiedenen Spezies unterschiedliche Funktionen inne haben könnte. Eine σ^S -abhängige *ydcl*-Expression lässt jedoch auf die Beteiligung von Ydcl an der generellen Stressantwort schließen, was auch die Biofilmbildung beinhaltet und sowohl für *S. Typhimurium* (Jennings et al., 2011) als auch für *E. coli* (diese Arbeit) nachgewiesen werden konnte.

Es stellte sich heraus, dass RbsK, RbsR, YieP und PuuR unterschiedlich auf die Expression von CsgD und Curli-Fimbrien (*csgB::lacZ*) einwirken (Abb. 32), wobei die Zellhüllstress-vermittelte Inhibition der *csgD*-Expression (untersucht anhand von CpxR, RprA und RybB) nicht beeinflusst wird (Abb. 33).

Eine *yieP*-Deletionsmutante zeigte eine ähnlich reduzierte CsgD-Proteinmenge und *csgB::lacZ*-Expression an wie *dgcE*-, *yjdA*- und *yjcZ*-Deletionsmutanten, ohne dabei über das PdeR/DgcM/MlrA-Modul in die c-di-GMP-vermittelte *csgD*-Expression einzugreifen. Die drastisch reduzierte Expression des Biofilmmasterregulators CsgD in der $\Delta yieP$ -Mutante ging mit einem deutlich reduzierten Makrokolonie-Phänotypen einher, der jedoch interessanterweise noch etwas mehr Curli aufwies als die Makrokolonie einer $\Delta dgcE$ -Mutante. Die Funktion von YieP bleibt demnach unklar und scheint über einen bislang völlig unbekannten Mechanismus auf die Matrixproduktion einzuwirken.

Hingegen zeigten $\Delta rbsK$ und $\Delta rbsR$ -Mutanten eine überraschend geringe Biofilmbildung an. Trotz deutlich reduzierter CsgD- und *csgB::lacZ*-Expressionen, waren die gemessenen Expressionen dennoch höher als die für andere Deletionsmutanten mit vergleichsweise mehr Biofilmbildung ($\Delta dgcE$, $\Delta yjdA$, $\Delta yjcZ$, $\Delta yieP$). Hinzu kam ein verlangsamtes Wachstum der $\Delta rbsK$ - und $\Delta rbsR$ -Mutanten.

Die Ribokinase RbsK phosphoryliert Ribose zu D-Ribose-5-Phosphat und katalysiert somit den ersten Schritt des Ribose-Metabolismus (Hope et al., 1986). RbsR agiert als Transkriptionsrepressor des *rbs*-Operons (*rbsDACBKR*), wobei seine Bindeaffinität durch Ribose-Zugabe vermindert wird. Ribose agiert demnach als Induktor der Expression des *rbs*-Operons (Mauzy and Hermodson, 1992). Fehlt der Transkriptionsrepressor RbsR ($\Delta rbsR$), wird das *rbs*-Operon verstärkt exprimiert, sodass Ribose aufgrund erhöhter RbsK-Mengen wahrscheinlich vermehrt in phosphorylierter Form vorliegt. Eine Deletion von *rbsK* hingegen müsste mehr unphosphorylierte Ribose bewirken, welche wiederum als Induktor der *rbs*-Expression agiert. Folglich führen die Einzeldelation von *rbsK* und *rbsR* vermutlich beide zu einer erhöhten *rbs*-Expression, wobei die Auswirkungen auf die zellulären Ribose- und Ribose-5-Phosphat-Konzentrationen entgegengesetzt sein dürften.

Da beide Deletionsmutanten einen ähnlich stark reduzierten Makrokolonie-Phänotypen aufweisen, erscheint es wahrscheinlich, dass hierfür eher die vermehrte Expression des *rbs*-Operons ausschlaggebend ist (die in beiden Mutanten stattfindet) und weniger die Auswirkungen auf das Ribose/Ribose-5-Phosphat-Verhältnis (die in beiden Mutanten unterschiedlich sind). Da D-Ribose-5-Phosphat aber ein Schlüsselmetabolit für diverse biosynthetische Stoffwechselwege darstellt (z. B. für die Nukleotidbiosynthese) kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein gestörter Ribosestoffwechsel durch Mutationen innerhalb des *rbs*-Operons zu schwerwiegenden zellulären Beeinträchtigungen führt. Es ist demnach möglich, dass das beobachtete Wachstumsdefizit sowie die gestörte Biofilmbildung der

$\Delta rbsK$ und $\Delta rbsR$ -Mutanten auch ein Produkt gestörter Stoffwechselprozesse ist. Die spezifische Funktion von RbsK und RbsR in der Biofilmbildung bedarf vertiefter Analysen.

Eine Deletion von *puuR* resultierte zwar in einem Abfall der *csgB::lacZ*-Expression, dieser war jedoch weniger prominent als bei den meisten anderen untersuchten Genen.

PuuR ist am Metabolismus des Polyamins Putrescin beteiligt, indem es als Transkriptionsrepressor der σ^S -kontrollierten *puu*-Gene, deren Expression für den Abbau von Putrescin nötig ist, agiert. Putrescin dient als Kohlen- und Stickstoffquelle, stellt jedoch auch ein Vorläufermolekül für die Synthese eines weiteren Polyamins dar – Spermidin. Somit hat PuuR sehr wahrscheinlich einen regulatorischen Einfluss auf die intrazelluläre Polyamin-Konzentration (Nemoto et al., 2012).

In verschiedenen Bakterienspezies, wie z. B. *B. subtilis*, *P. aeruginosa* und *V. cholerae*, wurde ein positiver Zusammenhang zwischen Polyaminen und Biofilmbildung beschrieben (Burrell et al., 2010; Karatan et al., 2005; Williams et al., 2010). In einer Studie von Sakamoto et al. (2012) konnte ein solcher Zusammenhang auch für *E. coli* verdeutlicht werden. Die Autoren zeigten dabei, dass die Biofilmbildung einer Mutante, die auf Polyamin-Zugabe angewiesen ist, durch den Zusatz von Putrescin deutlich gefördert werden kann (Sakamoto et al., 2012).

Eine gesteigerte Transkription der *puu*-Gene in einer *puuR*-Deletionsmutante führt vermutlich zu verminderten zellulären Konzentrationen von Putrescin, da dieses vermehrt abgebaut wird. Demnach könnte der Effekt einer *puuR*-Deletion darin bestehen, eine reduzierte Polyamin-Konzentration und folglich Biofilmbildung zu bewirken. Wie genau sich die u. a. durch PuuR regulierten zellulären Polyaminmengen in die Signalkontrolle der Biofilmbildung einfügen, bleibt jedoch zu klären.

Da v. a. der Einfluss von RbsK, RbsR, YieP und PuuR auf die Biofilmbildung unklar blieb, diese aber offensichtlich auf die *csgD*-Expression einwirken, sollten die entsprechenden Deletionsmutanten in künftigen Studien auf zelluläre Mengen der sRNAs OmrA, OmrB, McaS, RydC und GcvB überprüft werden. All diese sRNAs binden an die 5'UTR-Region der *csgD*-mRNA, wodurch sie den Abbau dieser mRNA einleiten oder die Translation und folglich die CsgD-Proteinexpression behindern (Mika and Hengge, 2014). Der positive Einfluss von RbsK, RbsR, YieP und PuuR könnte darin liegen, diesem negativen regulatorischen Effekt entgegenzuwirken.

Interessanterweise kodieren nahezu sämtliche im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene für Transkriptionsfaktoren (außer *rbsK*, dessen Genprodukt RbsK aber an der Transkription des *rbs*-Operons beteiligt ist, indem es den Induktor Ribose phosphoryliert). Die Identifikation der Gene, die durch die hier beschriebenen Transkriptionsfaktoren reguliert werden, könnte letztlich Aufschluss darüber liefern, in welche biofilmrelevanten Prozesse sie regulatorisch eingreifen.

5.7 Flagellare Verknotungen als Signal der c-di-GMP-vermittelten Matrixexpression

Für die Biofilmbildung ist ein erster Kontakt zwischen einem Bakterium und einer Oberfläche entscheidend. Die Frage nach dem wahrgenommenen Signal, welches letztlich die erforderlichen zellulären Prozesse zur Biofilmbildung einleitet, ist jedoch zum großen Teil nach wie vor unklar und wird derzeit in verschiedenen Bakterienspezies intensiv beforscht.

In der Studie von Serra *et al.* (2013b) wurde beobachtet, dass weder $\Delta motA$ - noch $\Delta fliC$ -Mutanten zur Ausprägung der *E. coli* W3110-typischen Ringstruktur befähigt sind, was mit dem Fehlen der Flagellen bzw. einer verminderten Flagellenverknotung in der unteren Biofilmschicht einherging. Dies ließ vermuten, dass Flagellen als Strukturbestandteil von Makrokolonien sowie deren Fähigkeit zu rotationsbedingten Verknotungen in der unteren Makrokolonieschicht eine bedeutende Rolle für die Biofilmmatrixproduktion in oberen Schichten zukommt (Serra *et al.*, 2013b).

Die Daten dieser Promotionsarbeit konnten bestätigen, dass die MotA-vermittelte Flagellenrotation als Signal für eine wildtypische Biofilmbildung förderlich ist (Abb. 34A), wobei anhand einer *csgB::lacZ*-Reportergenfusion der quantitative Nachweis für eine verminderte Expression von Curli-Fimbrien in einer $\Delta motA$ -Mutante erbracht wurde (Abb. 34B & C).

Als Resultat von flagellaren Verknotungen wurde hier erstmalig eine verminderte Expression der Master-PDE PdeH festgestellt, welche spezifisch für das Wachstum auf Festmedium war (Abb. 37). Die verminderte Expression von *pdeH* könnte ebenfalls spezifisch sein, da die Expressionen der flagellaren Klasse 1 bzw. Klasse 2 Gene *flhDC* und *fliA* kaum oder gar nicht betroffen waren (Abb. 37). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Expression weiterer flagellarer Klasse 3 Gene (wie *pdeH*) durch flagellare Verknotungen betroffen ist. So könnte beispielsweise auch die Expression der Flagellenuntereinheiten sowie der Motorproteine selbst betroffen sein, sodass flagellare Verknotungen zusätzlich zur flagellaren Inhibition beitragen könnten.

Der Mechanismus der *pdeH*-Expressionskontrolle durch ein flagellengeneriertes Signal konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Es ist anzunehmen, dass ein bislang unbekannter Mechanismus Flagellenverknotungen als mechanisches Signal wahrnimmt und daraufhin die Expression von *pdeH* (und gegebenenfalls weiterer flagellarer Komponenten) reguliert. Die Bestimmung zellulärer PdeH-Proteinmengen in $\Delta motA$ -Mutanten könnte weiterhin dazu beitragen, die hier generierten transkriptionellen Daten (*pdeH::lacZ*) zu stützen.

Die phänotypische Makrokoloniausprägung einer $\Delta motA \Delta pdeH$ -Doppelmutante entsprach der einer $\Delta pdeH$ -Einzelmutante (Abb. 34A). Da solch ein Phänotyp ($\Delta pdeH$) mit einer erhöhten zellulären c-di-GMP-Konzentration einhergeht (Sarenko et al., 2017), ist davon auszugehen, dass der Phänotyp der Doppelmutante ($\Delta motA \Delta pdeH$) ebenfalls auf vermehrte c-di-GMP-Mengen zurückgeht. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass flagellare Verknotungen ein mechanisches Signal darstellen, welches der Expression von *pdeH* entgegenwirkt und aufgrund der so verminderten globalen PDE-Aktivität folglich die zelluläre c-di-GMP-Konzentration steigert (Abb. 39).

In dieser Arbeit wurden jedoch komplette Kolonien für die Bestimmungen von Reporterexpressionen verwendet (z. B. *pdeH::lacZ*), sodass lediglich Mittelwerte einer gesamten Kolonie gewonnen wurden, ohne dabei zwischen unteren und oberen Koloniestrukturen zu unterscheiden. Klauck et al. (2018) konnten kürzlich mithilfe von *gfp*-Reporterfusionen anschaulich zeigen, dass die σ^{FliA} -kontrollierte *pdeH*-Expression im reifen Zentrum einer Makrokolonie fast ausschließlich auf untere Biofilmschichten beschränkt ist (Klauck et al., 2018). Demnach scheint ein mechanisches Signal, das vorwiegend in der unteren Biofilmschicht durch flagellierte Zellen zustande kommen dürfte, nicht unmittelbar in verminderter *pdeH*-Expression dieser Zellpopulation zu resultieren (da hier noch hohe *pdeH*-Expression stattfindet). Wie sich die herunterregulierte *pdeH*-Expression als Antwort auf flagellare Verknotungen letztlich erst in oberen Biofilmschichten manifestiert und so zur Matrixsynthese beiträgt, ist unklar. Mikroskopische Untersuchungen werden vonnöten sein, um die *pdeH*-Expression in Abhängigkeit von rotationsbedingten Flagellenverknotungen (*motA*^{+/−}) entlang von räumlichen Gradienten verfolgen zu können.

Die Daten dieser Arbeit weisen darauf hin, dass flagellare Verknotungen in unteren Biofilmschichten in der Initiation der c-di-GMP-vermittelten Matrixsynthese in oberen Schichten resultieren, indem die *pdeH*-Expression herunterreguliert wird (siehe oben). Da DgcE die Haupt-DGC ist, welche bei abnehmenden PdeH-Proteinmengen die Matrixsynthese einleitet (Sarenko et al., 2017), liegt die Vermutung nahe, dass eine herunterregulierte *pdeH*-Expression mit einem veränderten zellulären Gleichgewicht zwischen PdeH und DgcE (und evtl. weiterer DGCs) einhergeht.

Rotationsbedingte flagellare Verknotungen könnten somit dazu beitragen, das antagonistische System bestehend aus PdeH und DgcE zugunsten von DgcE zu beeinflussen (Abb. 39). So ließe sich auch die Makrokolonie einer $\Delta dgcE \Delta motA$ -Mutante erklären, die noch stärker reduziert war als die einer $\Delta dgcE$ -Mutante (Abb. 36A). Ausgehend von der oben beschriebenen Hypothese fehlt in einer solchen Mutante sowohl der inhibierende Effekt auf die *pdeH*-Expression ($\Delta motA$) als auch der antagonistische Effekt von DgcE auf PdeH ($\Delta dgcE$), sodass vermutlich insgesamt eine sehr geringe zelluläre c-di-GMP-

Konzentration und somit der stark reduzierte Makrokoloniephänotyp Zustand kommt (vgl. Abb. 39).

DgcE wirkt folglich nicht als direkter Sensor der flagellaren Verknotungen (Abb. 36). Eine verringerte *pdeH*-Expression könnte jedoch dazu führen, dass das PdeH/DgcE-Gleichgewicht zugunsten von DgcE verändert wird und somit die *csgD*-Expression eingeleitet wird. Künftige Messungen der zellulären c-di-GMP-Konzentrationen in den oben beschriebenen Mutanten werden nötig sein, um die Hypothese einer c-di-GMP-vermittelten Matrixsynthese aufgrund von flagellaren Verknotungen zu untermauern.

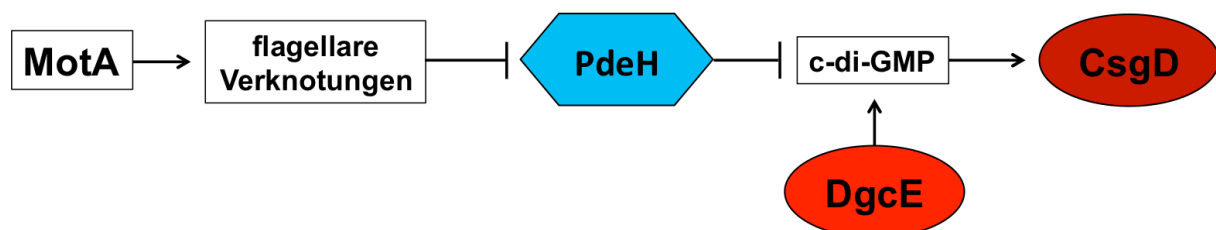


Abb. 39: Hypothese der Auswirkung von flagellaren Verknotungen als Signal der c-di-GMP-vermittelten Biofilmmatrixsynthese. Das Motorprotein MotA befähigt Flagellen zur Rotation und Motilität. In der unteren Schicht einer Makrokolonie resultiert MotA-vermittelte Flagellenrotation in einem Geflecht aus verknoteten Flagellen (Serra et al., 2013b), wodurch die Expression von *pdeH* auf bislang ungeklärte Weise herunterreguliert wird (Abb. 37). Dies könnte das zelluläre Gleichgewicht zwischen PdeH und DgcE (und evtl. weiterer DGCs) zugunsten von DgcE verändern, was wiederum die c-di-GMP-abhängige *csgD*- und folglich Matrixproduktion einleiten könnte. Details siehe Text.

Wie oben diskutiert wurde lassen die in dieser Arbeit generierten Daten auf einen zellulären c-di-GMP-Konzentrationsanstieg in *E. coli* als Resultat verknoteter Flagellen an der Anheftungsoberfläche schließen. Dies steht in Einklang mit einer zunehmenden c-di-GMP-Synthese in anderen Spezies wie beispielsweise *P. aeruginosa* und *C. crescentus*.

Die Oberflächenanheftung von *P. aeruginosa* wird über das Innermembranprotein PilJ sowie den Typ IV Pilus wahrgenommen, wobei das Eingangssignal auch hier unklar ist. Das Oberflächenprotein PilY1, welches mit dem Typ IV Pilus assoziiert ist, aktiviert die membranständige DGC SadC, woraufhin c-di-GMP produziert wird und Biofilmbildung initiiert wird bei gleichzeitiger Inhibierung der Motilität (O'Toole and Wong, 2016).

Kürzlich konnte auch für *C. crescentus* eindrucksvoll gezeigt werden, wie die Oberflächenanheftung durch einen rasanten c-di-GMP-Anstieg vermittelt wird. Ein erster Oberflächenkontakt wird über die Pili hergestellt. Diese werden daraufhin verkürzt, sodass der flagellare Pol in unmittelbaren Kontakt mit der Oberfläche gebracht wird. Der so generierte mechanische Druck auf die Rotor- und Statorkomponenten des Basalkörpers bewirkt ein bislang unbekanntes Signal, welches die DGC DgcB aktiviert. Der folgende rasante Anstieg von c-di-GMP bewirkt schließlich eine rasche Synthese des Holdfast-Proteins, welches die permanente Anheftung an die Oberfläche erlaubt (Hug et al., 2017).

Während mechanische Signale in *P. aeruginosa* und *C. crescentus* also in einem Anstieg der c-di-GMP-Konzentration durch die Aktivierung bestimmter DGCs eingeleitet wird, scheint *E. coli* dies durch die Herabregulierung einer PDE (PdeH) zu bewerkstelligen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bisher nicht getestete DGCs durch mechanische Signale zusätzlich aktiviert werden. DgcE schien hier aufgrund seiner Membranständigkeit ein naheliegender Kandidat zu sein, wobei sich herausstellte, dass DgcE nicht direkt an der Signalintegration beteiligt ist. Dass die Membranständigkeit keine zwingende Voraussetzung dafür ist, ein mechanisches Signal während der Oberflächenanheftung wahrzunehmen, zeigt das Beispiel von *C. crescentus*. Interessanterweise ist die DGC DgcB hier nicht membrangebunden, aber direkt mit dem flagellaren Basalkörper assoziiert. Pulldown-Experimente ließen dabei auf eine Interaktion zwischen DgcB und MotA schließen (Hug et al., 2017).

In künftigen Experimenten bezüglich der Integration mechanischer Signale in *E. coli* sollten demnach auch lösliche DGCs als potentielle Signalproteine nicht außer Acht gelassen werden. Deletionen sämtlicher DGCs in einem $\Delta motA$ -Stammhintergrund könnten klären, ob in *E. coli* neben der Herabregulierung einer PDE auch die Aktivierung ein oder mehrerer DGCs durch mechanische Reize stattfindet und so zur c-di-GMP-vermittelten Matrixsynthese beiträgt.

6 Referenzen

- Amikam, D., and Galperin, M.Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* (Oxford, England) 22, 3-6.
- Amsler, C.D., Cho, M., and Matsumura, P. (1993). Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. *J Bacteriol* 175, 6238-6244.
- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2000). Cache - a signaling domain common to animal Ca(2+)-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends Biochem Sci* 25, 535-537.
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., and Lindberg, M. (2001). Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* 204, 163-167.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2, 2006.0008.
- Banta, A.B., Chumanov, R.S., Yuan, A.H., Lin, H., Campbell, E.A., Burgess, R.R., and Gourse, R.L. (2013). Key features of sigmaS required for specific recognition by Crl, a transcription factor promoting assembly of RNA polymerase holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15955-15960.
- Baraquet, C., and Harwood, C.S. (2013). Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 18478-18483.
- Barembuch, C., and Hengge, R. (2007). Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of *Escherichia coli* are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol Microbiol* 65, 76-89.
- Barends, T.R., Hartmann, E., Griese, J.J., Beitlich, T., Kirienko, N.V., Ryjenkov, D.A., Reinstein, J., Shoeman, R.L., Gomelsky, M., and Schlichting, I. (2009). Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* 459, 1015-1018.
- Barnhart, M.M., and Chapman, M.R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* 60, 131-147.
- Bellini, D., Caly, D.L., McCarthy, Y., Bumann, M., An, S.Q., Dow, J.M., Ryan, R.P., and Walsh, M.A. (2014). Crystal structure of an HD-GYP domain cyclic-di-GMP phosphodiesterase reveals an enzyme with a novel trinuclear catalytic iron centre. *Mol Microbiol* 91, 26-38.

-
- Benach, J., Swaminathan, S.S., Tamayo, R., Handelman, S.K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J.E., Forouhar, F., Neely, H., Seetharaman, J., Camilli, A., *et al.* (2007). The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *Embo j* 26, 5153-5166.
- Bochner, B.R., and Ames, B.N. (1982). Complete analysis of cellular nucleotides by two-dimensional thin layer chromatography. *J Biol Chem* 257, 9759-9769.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M., Kaefer, V., Sourjik, V., Roth, V., and Jenal, U. (2010). Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* 141, 107-116.
- Bokranz, W., Wang, X., Tschäpe, H., and Römling, U. (2005). Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J Med Microbiol* 54, 1171-1182.
- Bramkamp, M. (2012). Structure and function of bacterial dynamin-like proteins. *Biological chemistry* 393, 1203-1214.
- Buckstein, M.H., He, J., and Rubin, H. (2008). Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 718-726.
- Burdette, D.L., Monroe, K.M., Sotelo-Troha, K., Iwig, J.S., Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Vance, R.E. (2011). STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 478, 515-518.
- Bureau, T.E., and Brown, R.M. (1987). In vitro synthesis of cellulose II from a cytoplasmic membrane fraction of *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6985-6989.
- Burrell, M., Hanfrey, C.C., Murray, E.J., Stanley-Wall, N.R., and Michael, A.J. (2010). Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential role in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *J Biol Chem* 285, 39224-39238.
- Bush, M.J., Tschowri, N., Schlimpert, S., Flardh, K., and Buttner, M.J. (2015). c-di-GMP signalling and the regulation of developmental transitions in streptomyces. *Nat Rev Microbiol* 13, 749-760.
- Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U., and Schirmer, T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17084-17089.
- Chapman, M.R., Robinson, L.S., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., and Hultgren, S.J. (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295, 851-855.
- Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L., and Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 465, 435-440.
-

-
- Chen, Z.H., and Schaap, P. (2012). The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium*. *Nature* **488**, 680-683.
- Chiba, S., Ito, K., and Akiyama, Y. (2006). The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. *Mol Microbiol* **60**, 448-457.
- Chilcott, G.S., and Hughes, K.T. (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 694-708.
- Chin, K.H., Lee, Y.C., Tu, Z.L., Chen, C.H., Tseng, Y.H., Yang, J.M., Ryan, R.P., McCarthy, Y., Dow, J.M., Wang, A.H., *et al.* (2010). The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* **396**, 646-662.
- Chou, S.H., and Galperin, M.Y. (2016). Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *J Bacteriol* **198**, 32-46.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M., and Jenal, U. (2006). Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem* **281**, 32015-32024.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., and Jenal, U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**, 30829-30837.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172-2175.
- Commichau, F.M., and Stülke, J. (2008). Trigger enzymes: bifunctional proteins active in metabolism and in controlling gene expression. *Mol Microbiol* **67**, 692-702.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**, 435-464.
- Da Re, S., and Ghigo, J.M. (2006). A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 3073-3087.
- Dahlstrom, K.M., Giglio, K.M., Collins, A.J., Sondermann, H., and O'Toole, G.A. (2015). Contribution of Physical Interactions to Signaling Specificity between a Diguanylate Cyclase and Its Effector. *mBio* **6**, e01978-01915.
- Dalbey, R.E., Wang, P., and van Dijl, J.M. (2012). Membrane proteases in the bacterial protein secretion and quality control pathway. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 311-330.
-

-
- Dartigalongue, C., Loferer, H., and Raina, S. (2001). EcfE, a new essential inner membrane protease: its role in the regulation of heat shock response in *Escherichia coli*. *Embo j* 20, 5908-5918.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.
- Daumke, O., and Praefcke, G.J. (2016). Invited review: Mechanisms of GTP hydrolysis and conformational transitions in the dynamin superfamily. *Biopolymers* 105, 580-593.
- De, N., Navarro, M.V., Raghavan, R.V., and Sondermann, H. (2009). Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol* 393, 619-633.
- Dove, S.L., and Hochschild, A. (2004). A bacterial two-hybrid system based on transcription activation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 261, 231-246.
- Duerig, A., Abel, S., Folcher, M., Nicollier, M., Schwede, T., Amiot, N., Giese, B., and Jenal, U. (2009). Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* 23, 93-104.
- Fang, X., Ahmad, I., Blanka, A., Schottkowski, M., Cimdins, A., Galperin, M.Y., Römling, U., and Gomelsky, M. (2014). GIL, a new c-di-GMP-binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. *Mol Microbiol* 93, 439-452.
- Ferenci, T. (2001). Hungry bacteria--definition and properties of a nutritional state. *Environmental microbiology* 3, 605-611.
- Ferreira, R.B., Antunes, L.C., Greenberg, E.P., and McCarter, L.L. (2008). *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J Bacteriol* 190, 851-860.
- Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14, 563-575.
- Galperin, M.Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental microbiology* 6, 552-567.
- Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N., and Koonin, E.V. (2001). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* 203, 11-21.
- Gerstel, U., Park, C., and Römling, U. (2003). Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol Microbiol* 49, 639-654.
- Girgis, H.S., Liu, Y., Ryu, W.S., and Tavazoie, S. (2007). A comprehensive genetic characterization of bacterial motility. *PLoS Genet* 3, 1644-1660.
- Gomelsky, M., and Klug, G. (2002). BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci* 27, 497-500.
-

-
- Grigorova, I.L., Phleger, N.J., Mutalik, V.K., and Gross, C.A. (2006). Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 5332-5337.
- Hall, C.W., and Mah, T.F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* *41*, 276-301.
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* *11*, 1034-1043.
- Hallez, R., Delaby, M., Sanselicio, S., and Viollier, P.H. (2017). Hit the right spots: cell cycle control by phosphorylated guanosines in alphaproteobacteria. *Nat Rev Microbiol* *15*, 137-148.
- Hammar, M.R., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A., and Normark, S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* *18*, 661-670.
- Hammer, N.D., Schmidt, J.C., and Chapman, M.R. (2007). The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12494-12499.
- Haurlyuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., and Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* *13*, 298-309.
- Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B.L., Mori, H., *et al.* (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* *2*, 2006 0007.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* *7*, 263-273.
- Hengge, R. (2010). Role of c-di-GMP in the regulatory networks of *Escherichia coli*. In: Visick KL, editor. *The Second Messenger Cyclic-di-GMP*. Washington, DC: ASM Press, 230–252. Wolfe A.J. and Visick K.L. (eds).
- Hengge, R. (2011). The general stress response in gram-negative bacteria. In: Hengge R, editor. *Bacterial Stress Responses*. Washington, DC: ASM press, 251–289, Storz, G., and Hengge, R. (eds).
- Hengge, R. (2016). Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* *371*.
- Hengge, R., Galperin, M.Y., Ghigo, J.M., Gomelsky, M., Green, J., Hughes, K.T., Jenal, U., and Landini, P. (2016). Systematic Nomenclature for GGDEF and EAL Domain-Containing Cyclic Di-GMP Turnover Proteins of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *198*, 7-11.
-

- Henley, J.R., Cao, H., and McNiven, M.A. (1999). Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 Suppl 2, S243-247.
- Henry, J.T., and Crosson, S. (2011). Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu Rev Microbiol* 65, 261-286.
- Herbst, S., Lorkowski, M., Sarenko, O., Nguyen, T.K.L., Jaenicke, T., and Hengge, R. (2018). Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di-GMP phosphodiesterase. *Embo j.*
- Ho, Y.S., Burden, L.M., and Hurley, J.H. (2000). Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J* 19, 5288-5299.
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35, 322-332.
- Hope, J.N., Bell, A.W., Hermodson, M.A., and Groarke, J.M. (1986). Ribokinase from *Escherichia coli* K12. Nucleotide sequence and overexpression of the rbsK gene and purification of ribokinase. *J Biol Chem* 261, 7663-7668.
- Huangyutitham, V., Guvener, Z.T., and Harwood, C.S. (2013). Subcellular clustering of the phosphorylated WspR response regulator protein stimulates its diguanylate cyclase activity. *mBio* 4, e00242-00213.
- Huberts, D.H., and van der Klei, I.J. (2010). Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* 1803, 520-525.
- Hug, I., Deshpande, S., Sprecher, K.S., Pfohl, T., and Jenal, U. (2017). Second messenger-mediated tactile response by a bacterial rotary motor. *Science* 358, 531-534.
- Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Crowley, J.R., Heuser, J., Chapman, M.R., Hadjifrangiskou, M., Henderson, J.P., and Hultgren, S.J. (2013). *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *mBio* 4, e00645-00613.
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* 54, 499-518.
- Jandhyala, S.M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., and Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 21, 8787-8803.
- Jennings, M.E., Quick, L.N., Soni, A., Davis, R.R., Crosby, K., Ott, C.M., Nickerson, C.A., and Wilson, J.W. (2011). Characterization of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ydcl gene, which encodes a conserved DNA binding protein required for full acid stress resistance. *J Bacteriol* 193, 2208-2217.

- Jishage, M., and Ishihama, A. (1998). A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4953-4958.
- Karatan, E., Duncan, T.R., and Watnick, P.I. (2005). NspS, a predicted polyamine sensor, mediates activation of *Vibrio cholerae* biofilm formation by norspermidine. *J Bacteriol* 187, 7434-7443.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5752-5756.
- Kiehler, B., Haggett, L., and Fujita, M. (2017). The PAS domains of the major sporulation kinase in *Bacillus subtilis* play a role in tetramer formation that is essential for the autokinase activity. *MicrobiologyOpen* 6.
- Klauck, G., Serra, D.O., Possling, A., and Hengge, R. (2018). Spatial organization of different sigma factor activities and c-di-GMP signalling within the three-dimensional landscape of a bacterial biofilm. *Open Biol* 8.
- Ko, M., and Park, C. (2000). Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 303, 371-382.
- Krasteva, P.V., Bernal-Bayard, J., Travier, L., Martin, F.A., Kaminski, P.A., Karimova, G., Fronzes, R., and Ghigo, J.M. (2017). Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. *Nature communications* 8, 2065.
- Krasteva, P.V., Giglio, K.M., and Sondermann, H. (2012). Sensing the messenger: the diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein science : a publication of the Protein Society* 21, 929-948.
- Lacey, M., Agasing, A., Lowry, R., and Green, J. (2013). Identification of the YfgF MASE1 domain as a modulator of bacterial responses to aspartate. *Open Biol* 3, 130046.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1991a). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J Bacteriol* 173, 4474-4481.
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1991b). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 5, 49-59.
- Le Quere, B., and Ghigo, J.M. (2009). BcsQ is an essential component of the *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Mol Microbiol* 72, 724-740.
- Lemke, J.J., Durfee, T., and Gourse, R.L. (2009). DksA and ppGpp directly regulate transcription of the *Escherichia coli* flagellar cascade. *Mol Microbiol* 74, 1368-1379.

- Lin, F.C., Brown, R.M., Jr., Drake, R.R., Jr., and Haley, B.E. (1990). Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc. *J Biol Chem* 265, 4782-4784.
- Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E., and Hengge, R. (2013). The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *Embo j* 32, 2001-2014.
- Liu, J., Noel, J.K., and Low, H.H. (2018). Structural basis for membrane tethering by a bacterial dynamin-like pair. *Nature communications* 9, 3345.
- Liu, M., Durfee, T., Cabrera, J.E., Zhao, K., Jin, D.J., and Blattner, F.R. (2005). Global transcriptional programs reveal a carbon source foraging strategy by *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280, 15921-15927.
- Ma, X., Sayed, N., Baskaran, P., Beuve, A., and van den Akker, F. (2008). PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure. *J Biol Chem* 283, 1167-1178.
- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K., and Gottesman, S. (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* 39, 1382-1394.
- Majdalani, N., Hernandez, D., and Gottesman, S. (2002). Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol* 46, 813-826.
- Mauzy, C.A., and Hermodson, M.A. (1992). Structural and functional analyses of the repressor, RbsR, of the ribose operon of *Escherichia coli*. *Protein science : a publication of the Protein Society* 1, 831-842.
- Mazur, O., and Zimmer, J. (2011). Apo- and cellopentaose-bound structures of the bacterial cellulose synthase subunit BcsZ. *J Biol Chem* 286, 17601-17606.
- McCullen, C.A., Benhammou, J.N., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2010). Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation. *J Bacteriol* 192, 5559-5571.
- Mika, F., Busse, S., Possling, A., Berkholz, J., Tschowri, N., Sommerfeldt, N., Pruteanu, M., and Hengge, R. (2012). Targeting of csgD by the small regulatory RNA RprA links stationary phase, biofilm formation and cell envelope stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84, 51-65.
- Mika, F., and Hengge, R. (2014). Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli*. *RNA biology* 11, 494-507.
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

- Miller, J.H. (1992). A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Möglich, A., Ayers, R.A., and Moffat, K. (2009). Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* (London, England : 1993) *17*, 1282-1294.
- Morgan, J.L., McNamara, J.T., and Zimmer, J. (2014). Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nature structural & molecular biology* *21*, 489-496.
- Morgan, J.L., Strumillo, J., and Zimmer, J. (2013). Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. *Nature* *493*, 181-186.
- Nelson, J.W., Sudarsan, N., Furukawa, K., Weinberg, Z., Wang, J.X., and Breaker, R.R. (2013). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nature chemical biology* *9*, 834-839.
- Nemoto, N., Kurihara, S., Kitahara, Y., Asada, K., Kato, K., and Suzuki, H. (2012). Mechanism for regulation of the putrescine utilization pathway by the transcription factor PuuR in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* *194*, 3437-3447.
- Nenninger, A.A., Robinson, L.S., and Hultgren, S.J. (2009). Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 900-905.
- Newell, P.D., Monds, R.D., and O'Toole, G.A. (2009). LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3461-3466.
- Nikolskaya, A.N., Mulkidjanian, A.Y., Beech, I.B., and Galperin, M.Y. (2003). MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *J Mol Microbiol Biotechnol* *5*, 11-16.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* *54*, 49-79.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* *28*, 449-461.
- O'Toole, G.A., and Wong, G.C. (2016). Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Curr Opin Microbiol* *30*, 139-146.
- Ogasawara, H., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2010). Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* *312*, 160-168.

- hr/>
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., and Lino, T. (1992). A novel transcriptional regulation mechanism in the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*: an antisigma factor inhibits the activity of the flagellum-specific sigma factor, sigma F. *Mol Microbiol* 6, 3149-3157.
- Olivares, A.O., Baker, T.A., and Sauer, R.T. (2016). Mechanistic insights into bacterial AAA+ proteases and protein-remodelling machines. *Nat Rev Microbiol* 14, 33-44.
- Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Melida, H., Mazur, O., Bulone, V., and Zimmer, J. (2013). BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17856-17861.
- Orr, M.W., Donaldson, G.P., Severin, G.B., Wang, J., Sintim, H.O., Waters, C.M., and Lee, V.T. (2015). Oligoribonuclease is the primary degradative enzyme for pGpG in *Pseudomonas aeruginosa* that is required for cyclic-di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E5048-5057.
- Ozaki, S., Matsuda, Y., Keyamura, K., Kawakami, H., Noguchi, Y., Kasho, K., Nagata, K., Masuda, T., Sakiyama, Y., and Katayama, T. (2013). A replicase clamp-binding dynamin-like protein promotes colocalization of nascent DNA strands and equipartitioning of chromosomes in *E. coli*. *Cell Rep* 4, 985-995.
- Papenfort, K., Pfeiffer, V., Mika, F., Lucchini, S., Hinton, J.C., and Vogel, J. (2006). SigmaE-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol Microbiol* 62, 1674-1688.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F., and Harshey, R.M. (2010). The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* 38, 128-139.
- Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H., and Jenal, U. (2007). Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *J Biol Chem* 282, 29170-29177.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A., and Hengge, R. (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 22, 2434-2446.
- Pesavento, C., and Hengge, R. (2009). Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr Opin Microbiol* 12, 170-176.
- Pesavento, C., and Hengge, R. (2012). The global repressor FliZ antagonizes gene expression by sigmaS-containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* 40, 4783-4793.
- Ponting, C.P., and Aravind, L. (1997). PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Current biology* : CB 7, R674-677.

- hr/>
- Povolotsky, T.L., and Hengge, R. (2012). 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. *Journal of biotechnology* 160, 10-16.
- Povolotsky, T.L., and Hengge, R. (2016). Genome-Based Comparison of Cyclic Di-GMP Signaling in Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Strains. *J Bacteriol* 198, 111-126.
- Pratt, L.A., and Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30, 285-293.
- Pratt, L.A., and Silhavy, T.J. (1998). Crl stimulates RpoS activity during stationary phase. *Mol Microbiol* 29, 1225-1236.
- Prigent-Combaret, C., Brombacher, E., Vidal, O., Ambert, A., Lejeune, P., Landini, P., and Dorel, C. (2001). Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol* 183, 7213-7223.
- Pultz, I.S., Christen, M., Kulasekara, H.D., Kennard, A., Kulasekara, B., and Miller, S.I. (2012). The response threshold of *Salmonella* PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP. *Mol Microbiol* 86, 1424-1440.
- Purcell, E.B., and Tamayo, R. (2016). Cyclic diguanylate signaling in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 40, 753-773.
- Qi, Y., Chuah, M.L., Dong, X., Xie, K., Luo, Z., Tang, K., and Liang, Z.X. (2011). Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J Biol Chem* 286, 2910-2917.
- Rani, S.A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R.A., Lewandowski, Z., Davison, W.M., Buckingham-Meyer, K., and Stewart, P.S. (2007). Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol* 189, 4223-4233.
- Rao, F., Yang, Y., Qi, Y., and Liang, Z.X. (2008). Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190, 3622-3631.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W., and Sonenshein, A.L. (2001). *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev* 15, 1093-1103.
- Reinders, A., Hee, C.S., Ozaki, S., Mazur, A., Boehm, A., Schirmer, T., and Jenal, U. (2016). Expression and Genetic Activation of Cyclic Di-GMP-Specific Phosphodiesterases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 198, 448-462.
- Richter, A.M. (2016). c-di-GMP-abhängige Signaltransduktion bei der Kontrolle der Cellulose-Synthese in *Escherichia coli* Biofilmen (Dissertation). Berlin: Humboldt-Universität zu Berlin.

- Robinson, L.S., Ashman, E.M., Hultgren, S.J., and Chapman, M.R. (2006). Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol Microbiol* 59, 870-881.
- Römling, U. (2005). Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 1234-1246.
- Römling, U., and Galperin, M.Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends Microbiol* 23, 545-557.
- Römling, U., Galperin, M.Y., and Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 1-52.
- Römling, U., Rohde, M., Olsen, A., Normark, S., and Reinkoster, J. (2000). AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* 36, 10-23.
- Römling, U., Sierralta, W.D., Eriksson, K., and Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol* 28, 249-264.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., *et al.* (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325, 279-281.
- Ross, W., Sanchez-Vazquez, P., Chen, A.Y., Lee, J.H., Burgos, H.L., and Gourse, R.L. (2016). ppGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response. *Mol Cell* 62, 811-823.
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Römling, U., and Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* 281, 30310-30314.
- Sakamoto, A., Terui, Y., Yamamoto, T., Kasahara, T., Nakamura, M., Tomitori, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Michael, A.J., Igarashi, K., *et al.* (2012). Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 1877-1886.
- Sakoh, M., Ito, K., and Akiyama, Y. (2005). Proteolytic activity of HtpX, a membrane-bound and stress-controlled protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280, 33305-33310.

-
- Sarenko, O., Klauck, G., Wilke, F.M., Pfiffer, V., Richter, A.M., Herbst, S., Kaefer, V., and Hengge, R. (2017). More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP-Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*. *mBio* 8.
- Schirmer, T. (2016). C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation. *J Mol Biol* 428, 3683-3701.
- Schirmer, T., and Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* 7, 724-735.
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., and Gomelsky, M. (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* 187, 4774-4781.
- Serra, D.O., and Hengge, R. (2014). Stress responses go three dimensional - the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environmental microbiology* 16, 1455-1471.
- Serra, D.O., Klauck, G., and Hengge, R. (2015). Vertical stratification of matrix production is essential for physical integrity and architecture of macrocolony biofilms of *Escherichia coli*. *Environmental microbiology* 17, 5073-5088.
- Serra, D.O., Mika, F., Richter, A.M., and Hengge, R. (2016). The green tea polyphenol EGCG inhibits *E. coli* biofilm formation by impairing amyloid curli fibre assembly and downregulating the biofilm regulator CsgD via the sigma(E) -dependent sRNA RybB. *Mol Microbiol* 101, 136-151.
- Serra, D.O., Richter, A.M., and Hengge, R. (2013a). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J Bacteriol* 195, 5540-5554.
- Serra, D.O., Richter, A.M., Klauck, G., Mika, F., and Hengge, R. (2013b). Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio* 4, e00103-00113.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* 189, 8746-8749.
- Shapiro, J.A. (1987). Organization of developing *Escherichia coli* colonies viewed by scanning electron microscopy. *J Bacteriol* 169, 142-156.
- Shimada, T., Fujita, N., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2011). Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources. *PLoS One* 6, e20081.
- Shimohata, N., Chiba, S., Saikawa, N., Ito, K., and Akiyama, Y. (2002). The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with a cytosolic active site. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 7, 653-662.
-

- Smith, K.D., and Strobel, S.A. (2011). Interactions of the c-di-GMP riboswitch with its second messenger ligand. *Biochemical Society transactions* 39, 647-651.
- Solomon, L., Shah, A., Hannagan, S., and Wilson, J.W. (2014). Bacterial genus-specific tolerance for YdcI expression. *Current microbiology* 69, 640-648.
- Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., and Hengge, R. (2009). Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* 155, 1318-1331.
- Song, B.D., Leonard, M., and Schmid, S.L. (2004). Dynamin GTPase domain mutants that differentially affect GTP binding, GTP hydrolysis, and clathrin-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 279, 40431-40436.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., and Bertin, P. (1999). Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the *flhDC* master operon. *J Bacteriol* 181, 7500-7508.
- Soutourina, O.A., and Bertin, P.N. (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 27, 505-523.
- Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6, 199-210.
- Storz, G., editor., and Hengge, R., editor. (2011). *Bacterial Stress Responses*. Washington DC: ASM press, 251–289.
- Suchanek, V.M. (2016). Role of Motility and its Regulation in *Escherichia coli* Biofilm formation (Dissertation). Heidelberg: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Sundriyal, A., Massa, C., Samoray, D., Zehender, F., Sharpe, T., Jenal, U., and Schirmer, T. (2014). Inherent regulation of EAL domain-catalyzed hydrolysis of second messenger cyclic di-GMP. *J Biol Chem* 289, 6978-6990.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D.A., and Gomelsky, M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* 281, 34751-34758.
- Tatsuta, T., Tomoyasu, T., Bukau, B., Kitagawa, M., Mori, H., Karata, K., and Ogura, T. (1998). Heat shock regulation in the *ftsH* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of sigma32 in vivo. *Mol Microbiol* 30, 583-593.
- Tchigvintsev, A., Xu, X., Singer, A., Chang, C., Brown, G., Proudfoot, M., Cui, H., Flick, R., Anderson, W.F., Joachimiak, A., *et al.* (2010). Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol* 402, 524-538.

-
- Thongsomboon, W., Serra, D.O., Possling, A., Hadjineophytou, C., Hengge, R., and Cegelski, L. (2018). Phosphoethanolamine cellulose: A naturally produced chemically modified cellulose. *Science* **359**, 334-338.
- Tomoyasu, T., Takaya, A., Isogai, E., and Yamamoto, T. (2003). Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol Microbiol* **48**, 443-452.
- Tschowri, N., Busse, S., and Hengge, R. (2009). The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **23**, 522-534.
- Tschowri, N., Schumacher, M.A., Schlimpert, S., Chinnam, N.B., Findlay, K.C., Brennan, R.G., and Buttner, M.J. (2014). Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development. *Cell* **158**, 1136-1147.
- Typas, A., Barembruch, C., Possling, A., and Hengge, R. (2007). Stationary phase reorganisation of the *Escherichia coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of sigma activity and levels. *EMBO J* **26**, 1569-1578.
- Ubarretxena-Belandia, I., and Engelman, D.M. (2001). Helical membrane proteins: diversity of functions in the context of simple architecture. *Current opinion in structural biology* **11**, 370-376.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15264-15269.
- van der Bliek, A.M. (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* **9**, 96-102.
- Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U., and Schirmer, T. (2007). Structure of BeF3⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure (London, England : 1993)* **15**, 915-927.
- Watnick, P.I., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Croal, L., and Kolter, R. (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol* **39**, 223-235.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., and Hengge, R. (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**, 1014-1034.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., and Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* **187**, 1591-1603.
-

- Westphal, K., Langklotz, S., Thomanek, N., and Narberhaus, F. (2012). A trapping approach reveals novel substrates and physiological functions of the essential protease FtsH in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 287, 42962-42971.
- Whitney, J.C., Colvin, K.M., Marmont, L.S., Robinson, H., Parsek, M.R., and Howell, P.L. (2012). Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 287, 23582-23593.
- Williams, B.J., Du, R.H., Calcutt, M.W., Abdolrasulnia, R., Christman, B.W., and Blackwell, T.S. (2010). Discovery of an operon that participates in agmatine metabolism and regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 76, 104-119.
- Wong, H.C., Fear, A.L., Calhoon, R.D., Eichinger, G.H., Mayer, R., Amikam, D., Benziman, M., Gelfand, D.H., Meade, J.H., Emerick, A.W., *et al.* (1990). Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8130-8134.
- Wood, T.K., Gonzalez Barrios, A.F., Herzberg, M., and Lee, J. (2006). Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72, 361-367.
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., and Römling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39, 1452-1463.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und lediglich auf der Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Hilfen angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten habe.

Ich versichere, dass ich mich weder anderwärts um einen Doktorgrad beworben habe noch einen entsprechenden Doktorgrad besitze.

Ich versichere, dass diese Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht, angenommen oder abgelehnt wurden.

Ich versichere, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberatern stattfand.

Ich versichere, dass ich die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung zur Kenntnis genommen habe.

.....
Datum / Unterschrift